

Acridonbiosynthese in *Ruta graveolens* L. : Molekularbiologie und Biochemie der Anthranilat *N*-Methyltransferase



DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Britta Rohde
aus Koblenz

Marburg an der Lahn, Februar 2008

Vom Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen am: 27.2.08
Erstgutachter: Herr Professor Dr. Ulrich Matern
Zweitgutachter: Frau Professor Dr. Maike Petersen
Tag der mündlichen Prüfung: 27.2.08

*“Viele Wege führen zum Gipfel eines Berges,
doch die Aussicht bleibt die gleiche“*

-Chinesische Weisheit-

Veröffentlichungen, Vorträge und Präsentationen

Wesentliche Auszüge dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Publikationen

Rohde, B., Hans, J., Martens, S., Baumert, A., Hunziker, P. and Matern, U. (2008): Anthranilate *N*-methyltransferase, a branch-point enzyme of acridone biosynthesis. *The Plant Journal* **53**, 541-553.

Vorträge

Rohde B., Hans J., Matern U.:
Biochemistry and cDNA cloning of anthranilate *N*-methyltransferase from *Ruta graveolens* L..
Joint Meeting of the Czech, German and Hungarian Pharmaceutical Societies.
Marburg, 2006.

Poster

Rohde B., Hans J., Matern U.:
Biochemistry and cDNA cloning of anthranilate *N*-methyltransferase from *Ruta graveolens* L..
Botanikertagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft.
Hamburg, 3.9.-7.9.2007.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
A. 1 <i>Ruta graveolens</i> L.	1
A. 1.1 Botanik	1
A. 1.2 Geschichte und medizinische Bedeutung	3
A. 1.3 Inhaltsstoffe	4
A. 2 Acridonalkaloide	6
A. 3 Biosynthese der Acridonalkaloide in <i>Ruta graveolens</i> L.	8
A. 4 Methyltransferasen (MTn)	13
A. 4.1 Pflanzliche Methyltransferasen	13
A. 4.1.1 <i>O</i> -Methyltransferasen (OMTn)	13
A. 4.1.2 <i>N</i> -Methyltransferasen (NMTn)	15
A. 4.1.3 Weitere pflanzliche SAM-abhängige MTn	17
A. 4.2 Konservierte Sequenzmotive	19
A. 4.3 Kristallstruktur und Methylierungsmechanismus pflanzlicher MTn	20
A. 4.4 Zielsetzung	23
B. Material	24
B. 1 Chemikalien und Hilfsmittel	24
B. 2 Radiochemikalien	25
B. 3 Substrate	25
B. 4 Enzyme	25
B. 5 Proteine und Antiseren	26
B. 6 Kommerzielle Reaktionsansätze (Kits) und sonstiges Verbrauchsmaterial	26
B. 7 Bakterienstämme	26
B. 8 Vektoren	26
B. 9 Puffer und Lösungen	26
B. 9.1 Pflanzenzellkulturen	26
B. 9.2 SDS-PAGE	27
B. 9.3 Agarose-Gelelektrophorese	27
B. 9.4 RNA Isolierung	27
B. 9.5 Herstellung kompetenter Zellen	28
B. 9.6 Plasmid-DNA Isolierung	28
B. 9.7 FPLC	28
B. 9.8 Metallchelatchromatographie (IMAC)	29
B. 9.9 Puffer für Enzymtest	30
B. 9.10 Puffer für Bakterienaufschluss	30
B. 9.11 Puffer und Lösungen für Western Blot Analyse	30
B. 10 DC-Platten und Laufmittel	30
B. 11 Säulenmaterialien	31
B. 12 Medien	31
B. 13 Geräte	32
C. Methoden	33
C. 1 Pflanzenmaterial	33
C. 1.1 <i>Ruta graveolens</i> Pflanzen	33
C. 1.2 Zellsuspensionskulturen	33
C. 1.2.1 Kultivierung	33
C. 1.2.2 Induktion	33
C. 1.2.2.1 Induktion für RNA-Extraktion	33
C. 1.2.2.2 Induktion für Proteinextraktion	34

C. 1.2.3	Ernte	34
C. 2	Molekularbiologische Methoden.....	34
C. 2.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	34
C. 2.2	Agarosegel-Elektrophorese	35
C. 2.3	Gehaltsbestimmung von Nukleinsäuren.....	35
C. 2.4	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	35
C. 2.5	Reverse Transkription	36
C. 2.6	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	36
C. 2.6.1	Synthese von Oligonukleotiden	36
C. 2.6.2	ANMT-spezifische PCR	37
C. 2.6.3	RACE (R apid A mplification of c DNA E nds)	38
C. 2.6.3.1	3'-RACE	38
C. 2.6.3.2	5'-RACE	38
C. 2.7	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	39
C. 2.8	Transformation kompetenter Bakterienzellen.....	39
C. 2.9	Plasmid-DNA Isolierung (Alkalische Lyse)	39
C. 2.10	Gelelution	40
C. 2.11	Heterologe Expression	40
C. 2.11.1	Expressionsspezifische PCR	40
C. 2.11.2	Restriktionsverdau.....	41
C. 2.11.3	Klonierung in den Expressionsvektor	41
C. 2.11.4	Transformation in BL21-Zellen	41
C. 2.11.5	Induktion transformierter BL21-Zellen.....	41
C. 2.11.6	Aufschluss induzierter BL21-Zellen	42
C. 2.12	Semiquantitative Reverse Transkriptase PCR.....	42
C. 3	Biochemische Methoden	43
C. 3.1	Rohextraktgewinnung	43
C. 3.2	Fraktionierende Ammoniumsulfatfällung.....	43
C. 3.3	Allgemeine proteinbiochemische Methoden.....	43
C. 3.3.1	Proteinbestimmung.....	43
C. 3.3.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
C. 3.4	FPLC-Reinigung der nativen ANMT.....	45
C. 3.4.1	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	45
C. 3.4.2	Gelpermeationschromatographie (GPC)	45
C. 3.4.3	Anionenaustauscherchromatographie	46
C. 3.4.4	Affinitätschromatographie	46
C. 3.5	SDS-Gel für die Mikrosequenzierung.....	47
C. 3.6	Proteinsequenzanalyse (MALDI-TOF).....	47
C. 3.7	Reinigung der rekombinanten ANMT	47
C. 3.7.1	Metallchelatchromatographie (IMAC).....	47
C. 3.7.2	Anionenaustauscherchromatographie	48
C. 3.8	Charakterisierung der rekombinanten ANMT	48
C. 3.8.1	Relative Molmasse	48
C. 3.8.2	Biochemische Charakterisierung.....	49
C. 3.8.2.1	Kontrolle der ANMT-Reinigung aus Zellkulturen.....	49
C. 3.8.2.2	Enzymtest für die rekombinante ANMT	49
C. 3.8.2.3	pH-Abhängigkeit	50
C. 3.8.2.4	Temperaturabhängigkeit.....	50
C. 3.8.2.5	Zeitlinearität.....	50
C. 3.8.2.6	Proteinlinearität	50
C. 3.8.2.7	Metallabhängigkeit	50

C. 3.8.2.8	Substratspezifität	51
C. 3.8.2.9	Stabilität der ANMT	51
C. 3.8.2.10	K_m -Wertbestimmungen	51
C. 3.9	Radioaktivitätsmessungen	52
C. 3.10	Dünnschichtchromatographie	52
C. 3.11	HPLC	52
C. 3.12	Massenspektroskopische Bestimmung	53
C. 3.13	Polyklonaler ANMT-Antikörper	53
C. 3.13.1	Anti-ANMT-Serum	53
C. 3.13.2	Aufreinigung polyklonaler Antikörper	53
C. 3.13.3	Induktion der RgANMT in Zellkulturen	54
C. 4	Datenanalyse und phylogenetische Untersuchungen	55
D.	Ergebnisse	56
D. 1	Reinigung der ANMT aus <i>Ruta graveolens</i> L. Zellkulturen	56
D. 1.1	Rohextraktgewinnung und fraktionierende Ammoniumsulfatfällung	56
D. 1.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	57
D. 1.3	Gelpermeationschromatographie (GPC)	58
D. 1.4	Anionenaustauscherchromatographie	59
D. 1.5	Affinitätschromatographie an Adenosin-Agarose	60
D. 1.6	SDS-PAGE für die Mikrosequenzierung	62
D. 1.7	Partielle Mikrosequenzierung	62
D. 2	Molekularbiologie der ANMT	63
D. 2.1	Spezifische degenerierte Primer	63
D. 2.2	Amplifizierung eines ersten ANMT-spezifischen Fragmentes	64
D. 2.3	Verlängerung zur vollständigen cDNA	65
D. 3	Sequenzanalyse	67
D. 4	Heterologe Expression der rekombinanten ANMT	73
D. 5	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten ANMT	75
D. 5.1	Produktidentifizierung durch Radio- Dünnschichtchromatographie	75
D. 5.2	Produktidentifizierung mittels HPLC	76
D. 5.3	Produktidentifizierung mittels Massenspektrometrie	78
D. 5.4	Relative Molekularmasse der rekombinanten ANMT	80
D. 5.5	pH-Abhängigkeit	81
D. 5.6	Temperaturabhängigkeit	81
D. 5.7	Zeitlinearität	82
D. 5.8	Proteinlinearität	83
D. 5.9	Einfluss von Metallionen auf die ANMT-Aktivität	84
D. 5.10	Stabilität der ANMT	85
D. 5.11	K_m -Wertbestimmung für Anthranilat und SAM	88
D. 5.12	Substratspezifität	90
D. 6	Untersuchungen zur Induktion der ANMT in Zellkulturen	93
D. 7	Gewebespezifische Expression der ANMT	95
E.	Diskussion	97
E. 1	Reinigung der ANMT	97
E. 2	Partialsequenzen des ANMT-Polypeptids	99
E. 3	Klonierung der RgANMT aus Zellsuspensionskulturen	99
E. 4	Funktionelle Expression der ANMT in <i>E. coli</i>	102
E. 5	Biochemische Charakterisierung	103
E. 6	Substratspezifität	105
E. 6.1	Acridonalkaloidbiosynthese in <i>Ruta graveolens</i> L.	107
E. 7	Phylogenetische Zuordnung	109

E. 8	Expression der RgANMT.....	111
E. 9	Ausblick	113
F.	Zusammenfassung.....	115
G.	Anhang	119
G. 1	Vektorkarte pTZ57R	119
G. 2	Vektorkarte pET15b	120
H.	Literaturverzeichnis.....	121

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACS	Acridonsynthase
Amp	Ampicillin
ANMT	Anthranilat <i>N</i> -Methyltransferase
AP	Anchor Primer
AAP	Abridged Anchor Primer
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Anthranilatsynthase
ATP	Adenosintriphosphat
BAMT	Benzoat- <i>O</i> -Methyltransferase
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar(e)
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin (b ovine s erum a lbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBB	Coomassie Brilliantblau
cpm	Zählungen pro Minute (c ounts p er m inute)
cDNA	komplementäre DNA
CHS	Chalkonsynthase
ChOMT	Chalkon- <i>O</i> -Methyltransferase
Ci	Curie
CM	Chorismatmutase
CNMT	Cocclaurin- <i>N</i> -Methyltransferase
COMT	Kaffeat- <i>O</i> -Methyltransferase
CCoAOMT	Kaffeoyl-CoA <i>O</i> -Methyltransferase
CoA	Coenzym A
DAD	Dioden-Array-Spektrum
DEAE	Diethylaminoethyl
dest.	destilliert
Da	Dalton
DMA	1,3-Dihydroxy- <i>N</i> -methylacridon
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute (d isintegration p er m inute)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	Elektrospray Ionisierung
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GPC	Gelpermeationschromatographie (g el p ermeation c hromatography)
h	Stunden
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie (h ydrophobic i nteraction c hromatography)
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Metallchelatchromatographie (i mmobilized m etal i on a ffinity c hromatography)
IOMT	Isoflavon- <i>O</i> -Methyltransferase

IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
K _{av}	Verteilungskoeffizient
kat	Katal
kb	Kilobase(npaare)
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
K _{pi}	Kaliumphosphatpuffer
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	molar
MALDI-TOF	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation Time-of-flight
min	Minuten
M _r	relative Molekularmasse
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
n.b.	nicht bestimmt
MT	Methyltransferase
NBT	<i>p</i> -Nitroblau-tetrazoliumchlorid
NMT	<i>N</i> -Methyltransferase
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OMT	<i>O</i> -Methyltransferase
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion)
PBS	Phosphatgepufferte Saline
pI	isoelektrischer Punkt
PKS	Polyketidsynthase
<i>Pmg</i>	<i>Phytophthora megasperma</i> f. sp. <i>glycinea</i> (<i>P. sojae</i>)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RgANMT	<i>Ruta graveolens</i> Anthranilat <i>N</i> -Methyltransferase
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Reverse Transkription
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
s	Sekunden
SAH	<i>S</i> -Adenosyl-L-homocystein
SAM	<i>S</i> -Adenosyl-L-methionin
SAMT	Salicylat- <i>O</i> -Methyltransferase
SEC	Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography)
SDS	Natriumlaurylsulfat
SMT	<i>S</i> -Methyltransferase
STS	Stilbensynthase
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TTBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,05 % (v/v) Tween-20
U	Unit
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett Strahlung
V _e	Elutionsvolumen des Proteins
V _o	Ausschlussvolumen
V _t	Gelbettvolumen

V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Kodierung von Aminosäuren und Nukleotiden

Aminosäuren

Neutral:

Alanin	A	Ala
Glycin	G	Gly
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Tryptophan	W	Trp
Valin	V	Val

Polar:

Asparagin	N	Asn
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Methionin	M	Met
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tyrosin	Y	Tyr

Basisch:

Arginin	R	Arg
Histidin	H	His
Lysin	K	Lys

Sauer:

Aspartat	D	Asp
Glutamat	E	Glu

Nukleotide

Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T
Uracil	U

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Fünfzählige Endblüte der Infloreszenz von <i>Ruta graveolens</i>	2
Abb. 2: Schematische Darstellung von <i>Ruta graveolens</i> nach Thomé (1885)	2
Abb. 3: Struktur von Acridin und 1,3-Dihydroxy- <i>N</i> -methylacridon	6
Abb. 4: Struktur des Acronycins	7
Abb. 5: Stellung von Anthranilat im Primär- und Sekundärstoffwechsel von <i>Ruta graveolens</i> L.	8
Abb. 6: Methylierung von Anthranilat zu <i>N</i> -Methylantranilat in <i>Ruta graveolens</i> L.	9
Abb. 7: Schema zur Biosynthese der Acridonalkaloide in <i>Ruta graveolens</i>	12
Abb. 8: Relative Lage der konservierten Motive (I-V) im OMT-Peptid.	20
Abb. 9: Elutionsprofil einer HIC	57
Abb. 10: Elutionsprofil einer GPC	58
Abb. 11: Elutionsprofil eines Anionenaustauscherchromatographielaufes	59
Abb. 12: Elutionsprofil einer Affinitätschromatographie an Adenosin-Agarose	60
Abb. 13: SDS-PAGE einer Affinitätschromatographie	62
Abb. 14: Amplifizierung eines ersten ANMT-spezifischen Fragmentes	64
Abb. 15: 3'-und 5'-RACE der RgANMT	65
Abb. 16: Proofreading-PCR der RgANMT mit genspezifischen End-to-End-Primern	66
Abb. 17: cDNA und translatierte Polypeptidsequenz der ANMT aus <i>Ruta graveolens</i>	68
Abb. 18: Sequenzvergleich der ANMT mit ausgewählten annotierten MTn	70
Abb. 19: Phylogenetische Einordnung der RgANMT	71
Abb. 20: Kontrolle der Expression und Reinigung der ANMT durch SDS-PAGE	74
Abb. 21: Radio-Dünnschichtchromatographie des Extraktes einer ANMT-Inkubation	75
Abb. 22: HPLC-Trennungen zu ANMT-Inkubationen	76
Abb. 23: UV-Spektren von Standards gemessen durch DAD im Eluat	77
Abb. 24: Produktidentifizierung durch Massenspektrometrie	79
Abb. 25: Elution der RgANMT (roter Punkt) von einer kalibrierten Fractogel SEC-Säule	80
Abb. 26: Aktivität der rekombinanten ANMT in Abhängigkeit vom pH-Wert	81
Abb. 27: Aktivität der rekombinanten ANMT in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur	82
Abb. 28: Aktivität der rekombinanten ANMT in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	82
Abb. 29: Aktivität der rekombinanten ANMT in Abhängigkeit von der Proteinmenge	83
Abb. 30: Aktivität der rekombinanten ANMT in Abhängigkeit von verschiedenen Metallionen	84
Abb. 31: Stabilität der ANMT	85
Abb. 32: Einfluss des Einfrierens auf die ANMT-Aktivität	86
Abb. 33: Abhängigkeit der ANMT-Aktivität von der Anthranilat-Konzentration	88
Abb. 34: Abhängigkeit der ANMT-Aktivität von der SAM-Konzentration	89
Abb. 35: Dot-Blot Untersuchungen zur Abschätzung der Antikörperabsorption der Kaninchen-Anti- ANMT-Seren	93
Abb. 36: Analyse der Induktion von ANMT Proteinmenge und Aktivität in R-20 Zellsuspensionskulturen	94
Abb. 37: RT-PCR-Amplifizierung aus verschiedenen Geweben einer zweijährigen <i>Ruta graveolens</i> Pflanze	96
Abb. 38: Zuordnung katalytisch aktiver Sequenzmotive im Alignment	107
Abb. 39: Sequenzalignment zur Phylogenie der ANMT	109

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Struktur einiger wichtiger Inhaltsstoffe von <i>Ruta graveolens</i> L.	5
Tab. 2: Vergleich der konservierten Sequenzmotive von MTn	19
Tab. 3: Nukleotidsequenz aller in dieser Arbeit verwendeten Primer	37
Tab. 4: Proteine zum Größenvergleich bei Ausschlusschromatographie	48
Tab. 5: Reinigungstabelle für die ANMT aus <i>R. graveolens</i> Zellkulturen	61
Tab. 6: Partiaalsequenzen des 40 kDa Polypeptids	63
Tab. 7: Ähnlichkeit der ANMT zu Methyltransferasen	69
Tab. 8: ANMT-Aktivität nach mehrmaligem Einfrieren	86
Tab. 9: Substanzen getestet als potentielle Substrate für die ANMT	91
Tab. 10: Nukleotidvergleich der Primer nach Frick und Kutchan (1999) zu <i>RgANMT</i> -Teilsequenzen ..	100
Tab. 11: Vergleich der Sequenzen der degenerierten Primer mit <i>RgANMT</i> -Teilbereichen.	101

A. Einleitung

A. 1 *Ruta graveolens* L.

A. 1.1 Botanik

Ruta graveolens L., die Wein- oder Gartenraute, ist ein typischer Vertreter für die Familie der Rutaceae, der Rautengewächse. Die Familie umfasst überwiegend Sträucher und Bäume, die ubiquitär vorkommen, deren Hauptverbreitungsgebiet jedoch in den tropischen und gemäßigten Breiten Australiens und Südafrikas liegt. Sie ist vor allem wegen der Zitrusarten, u.a. Zitrone (*Citrus limon*) oder Orange (*Citrus sinensis*) von besonderer wirtschaftlicher Bedeutung. Einige Familienvertreter finden auch als Zierpflanzen Verwendung wie z.B. *Skimmia japonica* (Heywood, 1982).

Die systematische Einteilung der Rutaceae in der Literatur ist unterschiedlich (Danert, 1976; Heywood, 1982), meist wird die Familie neben den Simaroubaceae, Meliaceae und Leitneriaceae der Ordnung Rurales zugeordnet (Sitte *et al.*, 2002; Frohne und Jensen, 1998).

Die Gattung *Ruta* beinhaltet ca. 60 Arten, darunter auch *Ruta graveolens* L., eine kleine, immergrüne Staude (Heywood, 1982), deren Aussehen charakteristisch für die Gattung ist. Die Pflanze bildet mehrfach gefiederte Blätter mit abgerundeten Enden aus. Auffällig sind die leuchtend-gelben, vierzähligen Blüten mit den löffelartigen Blütenblättern. Nur die Endblüte der Infloreszenz besitzt die charakteristische Fünfzähligkeit der Familie (Abb. 1). Weitere Pflanzenmerkmale sind die Ausbildung eines Diskus zwischen Staub- und Fruchtblättern (Danert, 1976), sowie lysigene Ölbehälter, die über Stängel und Blätter verteilt sind (Klosa und Zänglein, 1987). Ursprünglich im Mittelmeerraum beheimatet, wurde die Weinraute durch menschliche Einflüsse in ganz Europa und fast weltweit verbreitet (Becela-Deller, 1995). Sie wächst auf trockenen, steinigen, kalkhaltigen Böden in warmen Lagen und hat eine Blütezeit von Juni bis August (Pahlow, 1993; Eilert, 1994). Neben *Ruta graveolens* konnte sich nur noch *Dictamnus albus* als weitere Rutaceae im gemäßigten Klima Mitteleuropas ausbreiten (Becela-Deller, 1991; Frohne und Jensen, 1998).



Abb. 1: Fünfzählige Endblüte der Infloreszenz von *Ruta graveolens*
(www.zauber-pflanze.de)

Es sind 2 verschiedene Unterarten von *Ruta graveolens* bekannt. Bei der kultivierten Form handelt es sich um *R. graveolens* ssp. *hortensis* (Miller) GAMS. Es gibt auch noch die Unterart *R. graveolens* ssp. *divaricata* (TENORE), die als Wildform in Karstgebieten um die Adria vorkommt (Eilert, 1994; Klosa und Zänglein, 1987). Abb. 2 zeigt eine zeichnerische Darstellung der gesamten Pflanze mit den charakteristischen Merkmalen.



Abb. 2: Schematische Darstellung von *Ruta graveolens* nach Thomé (1885)
(www.zum.de/stueber/thome/band3/tafel_006.html)

A. 1.2 Geschichte und medizinische Bedeutung

Ruta graveolens war bereits im 5 Jh. v. Chr. bei Hippokrates unter dem Namen 'Peganon' bekannt. Im Mittelalter fand ihre Verbreitung nördlich der Alpen statt, was durch schriftliche Erwähnungen belegt ist (Klosa und Zänglein, 1987). In dieser Zeit wurde sie als Gartenpflanze kultiviert und diente als Heil- und Gewürzpflanze (Becela-Deller, 1995). Im 18. und 19. Jh. erreichte sie Südamerika, Südafrika und China (Klosa und Zänglein, 1987). Sowohl in der Antike als auch im Mittelalter fand die Weinraute Anwendung bei Vergiftungen, gastrointestinalen Beschwerden, Gebärmutterkrämpfen sowie Augen- und Hautleiden (Becela-Deller, 1995). In der heutigen Zeit besitzt die Weinraute außer in der Homöopathie keine pharmazeutische Bedeutung mehr. Trotz spasmolytischer, verdauungsunterstützender und ödemprotektiver Eigenschaften bewertete die Kommission E des ehemaligen Bundesgesundheitsamts die Weinraute wegen zu hoher Nebenwirkungen als negativ. Daher wurde die Monographie aus dem Deutschen Arzneimittelcodex (DAC 2000) gestrichen. Ihre Anwendung in der Homöopathie besteht u.a. für Beschwerden an Muskeln, Knochen, Gelenken und Augen (Becela-Deller, 1995).

A. 1.3 Inhaltsstoffe

Aus *R. graveolens* konnten bisher über 200 verschiedene Inhaltsstoffe isoliert werden. Dabei zeigen sich wesentliche Unterschiede in den einzelnen Pflanzenorganen.

Ätherisches Öl

In den Wurzeln ist das ätherische Öl in Ölzellen gespeichert und besteht zum größten Teil aus den beiden Norsesquiterpenderivaten Pregeijeren und Geijeren. In den oberirdischen Teilen findet man fast ausschließlich 2-oxygenierte Alkanderivate mit den Hauptkomponenten Nonan-2-on, Nonan-2-ylacetat und Undecan-2-ylacetat. Oberirdisch erfolgt die Speicherung in lysigenen Ölbehältern (De Feo *et al.*, 2002; Eilert, 1994; Klosa und Zänglein, 1987).

Cumarine

Über 40 verschiedene Cumarine konnten bisher aus der Pflanze isoliert werden (Eilert, 1994), wobei besonders die linearen Furanocumarine wegen ihrer photoreaktiven Eigenschaften von Bedeutung sind (Milesi *et al.*, 2001). Vor allem in den Früchten konzentrieren sich die Furanocumarine mit 8 mg/g Trockengewicht. Der Gehalt in Blättern, Stängeln und Wurzeln ist im Vergleich dazu etwa um ein Fünftel geringer. Den größten Anteil in allen Pflanzenteilen macht das Bergapten mit mehr als 50 % aus (Milesi *et al.*, 2001; Tab. 1).

Flavonoide

In den Blüten werden Flavonolglykoside gebildet (Eilert, 1994). Das wichtigste Flavonoid in der Pflanze stellt das Rutin dar mit einem Gehalt von bis zu 5 % (Sprecher, 1958; Tab. 1).

Alkaloide

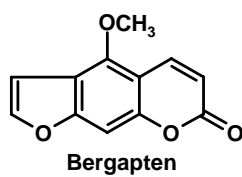
Es sind mehr als 40 Alkaloide der Typen (Furo)Chinoline und Acridone enthalten. Vor allem die Furochinoline Skimmianin und Dictamnin sind dabei hervorzuheben. Bei den Acridonen findet man Arborinin in den oberirdischen Teilen und verschiedene Furoacridone wie Gravacridondiol und Rutacridonepoxid überwiegend in den Wurzeln (Eilert, 1994; Junghanns *et al.*, 1998; Tab. 1).

Sonstige Inhaltsstoffe

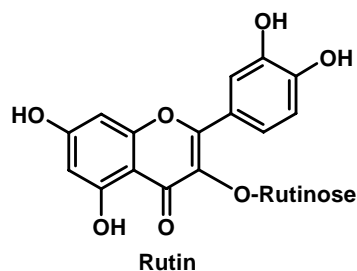
Von eher untergeordneter Bedeutung sind die in den Wurzeln vorhandenen Lignane und Anthrachinonderivate.

Tab. 1: Struktur einiger wichtiger Inhaltsstoffe von *Ruta graveolens* L.

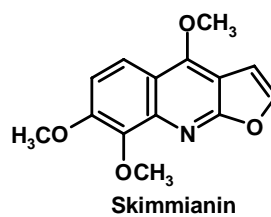
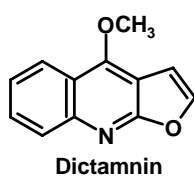
Cumarine:



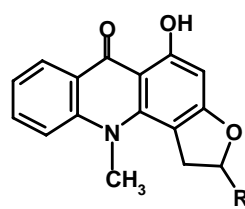
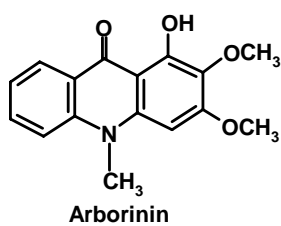
Flavonoide:



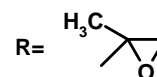
Alkaloide:



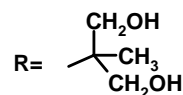
Furochinoline



Rutacridonepoxid



Gravacridondiol



Acridone

A. 2 Acridonalkaloide

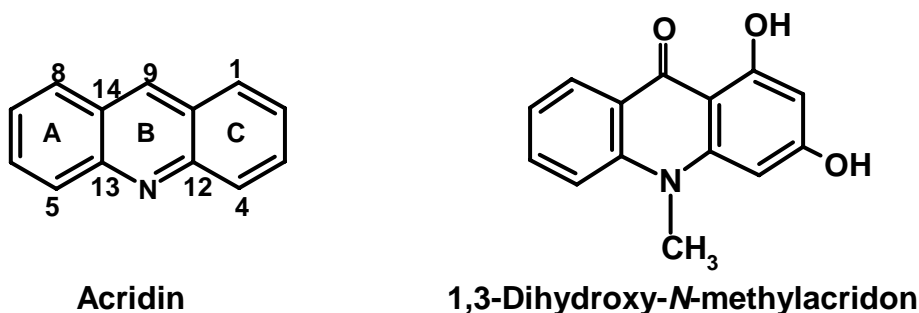


Abb. 3: Struktur von Acridin und 1,3-Dihydroxy-N-methylacridon

Vertreter der Acridonalkaloide wurden erstmals aus verschiedenen australischen Arten der Rutaceae isoliert (Gröger, 1988). Bis heute sind ca. 190 Sekundärmetabolite dieses Alkaloidtyps bekannt (Skaltsounis *et al.*, 2000), der dem Acridin ähnelt (Abb. 3), sich von diesem aber durch eine zusätzliche Ketogruppe in C9 unterscheidet, wie z.B. das 1,3-Dihydroxy-N-methylacridon (DMA; Abb. 3). Die überwiegende Zahl der Acridone besitzt zudem an Position 1 und 3 eine Sauerstofffunktion. Durch das meist methyliert vorliegende Stickstoffatom wird die Konjugation von Doppelbindungen unterbrochen (Gröger, 1988).

Mannigfaltige Strukturen können durch die Anknüpfung eines Furan- oder Pyranringes an den C-Ring entstehen (Gröger, 1988). Es sind auch dimere Acridonalkaloide bekannt (Skaltsounis *et al.*, 2000). In neueren Untersuchungen wurden N-Acetoxymethylderivate isoliert (Naidoo *et al.*, 2005).

Das Vorkommen der Acridonalkaloide beschränkt sich bisher mit Ausnahmen in den Simaroubaceae und Piperaceae auf die Familie der Rutaceae (Skaltsounis *et al.*, 2000; Parmar *et al.*, 1998). Meist sind die Acridone mit Furochinolinen und Cumarinen vergesellschaftet (Gröger, 1988; Skaltsounis *et al.*, 2000).

Die gelben, schwach basischen Verbindungen zeigen ein charakteristisches UV-Spektrum mit drei Absorptionsmaxima bei 240-280, 280-330 und 380-430 nm. Das Spektrum wird durch den pH-Wert beeinflusst, da im sauren Milieu das 9-Hydroxyacridinium-Ion vorliegt, während im alkalischen Bereich das 9-Hydroxyacridinat-Ion vorhanden ist (Skaltsounis *et al.*, 2000).

In der Pflanze findet man die Acridonalkaloide überwiegend in der Wurzel lokalisiert. Die Speicherung erfolgt in einem speziellen Zelltyp, den sogenannten Idioblasten, die mit den Milchsafttröhren bei *Papaver* vergleichbar sind. Dort werden sie in Form von Körnern in

Vakuolen gespeichert. Im Vergleich zu normalen Zellen gibt es in den acridonhaltigen Idioblasten keine zentrale Vakuole, sondern sie wird statt dessen durch eine Anzahl vieler kleiner ersetzt (Eilert *et al.*, 1986).

Da eine verstärkte Synthese durch Phytopathogene ausgelöst werden kann, handelt es sich bei einigen Acridonen höchstwahrscheinlich um Substanzen mit Phytoalexincharakter (Eilert *et al.*, 1986).

Die Acridonalkaloide weisen ein breites biologisches Wirkspektrum auf.

So konnten molluskizide, antivirale, antiplasmodische, algizide und antimykotische Wirkungen nachgewiesen werden, was wahrscheinlich durch eine Interkalation der Acridone mit der DNA als Wirkmechanismus gegeben ist (Junghanns *et al.*, 1998). Die größte Bedeutung für eine evtl. Anwendung am Menschen findet sich in ihrer antiproliferativen Wirkung, wobei vor allem die zytostatische Wirkung des Acronycins hervor zu heben ist (Skaltsounis *et al.*, 2000; Meepagala *et al.* 2005; Abb. 4). Diese biologischen Effekte führten in den fünfziger Jahren zu einem verstärkten Interesse an der Biosynthese der Acridonalkaloide.

Schon früh wurde postuliert, dass einfache Acridone durch Verknüpfung von Anthranilat mit drei Acetateinheiten über eine Polyketosäure gebildet werden. Genauere Untersuchungen der Acridonalkaloidbiosynthese waren dann durch *Ruta*-Zellsuspensionskulturen möglich (Gröger, 1988).

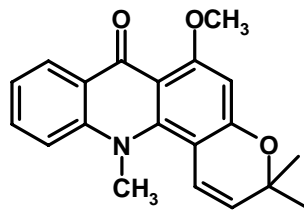
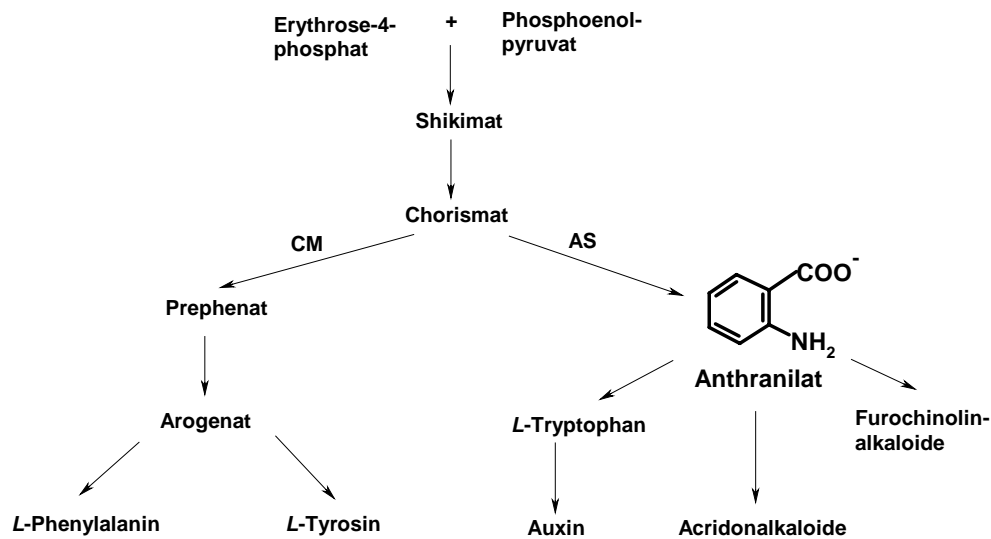


Abb. 4: Struktur des Acronycins

A. 3 Biosynthese der Acridonalkaloide in *Ruta graveolens* L.Abb. 5: Stellung von Anthranilat im Primär- und Sekundärstoffwechsel von *Ruta graveolens* L.

Anthranilat stellt einen wichtigen Grundbaustein dar (Abb. 5). Die Vorstufen für Anthranilat werden über den Shikimatweg gebildet. Chorismat, das dabei als Endprodukt entsteht, kann dann entweder durch die Chorismatmutase (CM) in die Synthese von *L*-Phenylalanin und *L*-Tyrosin eingeleitet werden oder durch die Anthranilatsynthase (AS) zum Anthranilat umgesetzt werden. In *Ruta graveolens* dient Anthranilat dann als Ausgangssubstrat für drei verschiedene Reaktionswege. Zum einen ist es für die Biosynthese von *L*-Tryptophan und nachfolgender Produkte notwendig. Gleichzeitig dient Anthranilat in *Ruta graveolens* aber auch als ein Grundbaustein für die Biosynthese von Furochinolinen und Acridonen im sekundären Stoffwechsel.

Die Biosynthese des einfachsten Acridonalkaloids, 1,3-Dihydroxy-*N*-methylacridon (DMA), erfolgt ausgehend von Anthranilat in drei Schritten, die z.T. *in vitro* umfassend untersucht wurden.

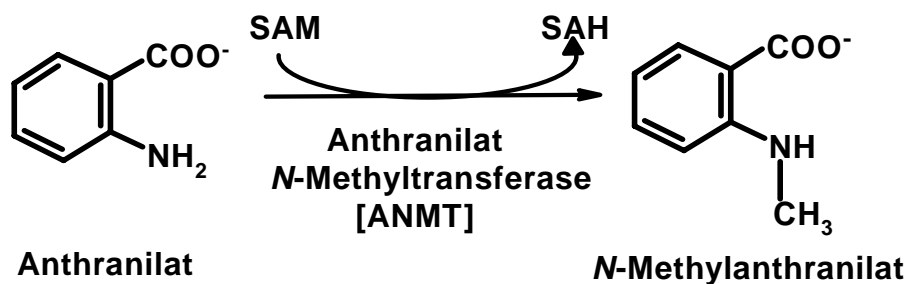
Anthranilat N-Methyltransferase (ANMT)

Abb. 6: Methylierung von Anthranilat zu N-Methylantranilat in *Ruta graveolens* L.

Für die Biosynthese der Acridonalkaloide in *Ruta* ist eine N-Methylierung erforderlich, die offensichtlich zu einem frühen Zeitpunkt der Acridonbiosynthese erfolgt. Die Methylierung ist deswegen so überaus wichtig, da dadurch das Substrat aus dem primären in den sekundären Stoffwechsel abgeleitet werden kann.

Mit zellfreien *Ruta graveolens*-Extrakten konnte eine N-Methylierung von Anthranilat unter Verwendung von S-Adenosyl-L-methionin (SAM) als Methyl donor demonstriert werden (Abb. 6), katalysiert durch die Anthranilat N-Methyltransferase (ANMT) (Baumert *et al.*, 1983). Deswegen wurde für die Bildung von Acridonalkaloiden in *Ruta graveolens* zunächst als erster spezifischer Schritt die N-Methylierung von Anthranilat postuliert (Abb. 6).

Nach partieller Reinigung (Maier *et al.*, 1995) aus *Ruta graveolens* Zellkulturen wurde die ANMT vorläufig charakterisiert. Berichtet wurde ein M_r von 62 kDa nach SDS-PAGE und 70 kDa nach Gelpermeationschromatographie, was auf ein Monomer schließen ließ. Das pH-Optimum lag im alkalischen Bereich. Es konnte keine Mg^{2+} -Abhängigkeit detektiert werden, wie für einige O-Methyltransferasen (OMTn) beschrieben. Bemerkenswert war die hohe Stabilität des Enzyms, die bereits schon zuvor aufgefallen war (Baumert *et al.*, 1983). Zum Zeitpunkt der partiellen ANMT-Reinigung durch Maier *et al.* (1995) waren nur wenige NMTn charakterisiert.

Das Enzym zeichnet sich außerdem durch eine hohe Spezifität aus, da bisher nur die Methylierung von Anthranilat durch das pflanzliche Enzym nachgewiesen werden konnte (Maier *et al.*, 1995). Außerdem scheint das Enzym nur in Pflanzen, die Acridonalkaloide bilden, vorzukommen (Gröger, 1988; Baumert *et al.*, 1983). Eine verstärkte Expression des bereits konstitutiv aktiven Gens ist durch Elizitoren induzierbar (Eilert und Wolters, 1989).

N-Methylantranilat:CoA Ligase

In der Biosynthese von Acridonen ist neben der bereits beschriebenen Methylierung auch ein Aktivierungsschritt notwendig. Jedoch ist auch hier der genaue Reaktionszeitpunkt noch nicht eindeutig geklärt.

Die Aktivierung kann auf Stufe von Anthranilat oder *N*-Methylantranilat erfolgen. Beide Möglichkeiten konnten mit zellfreien *Ruta*-Extrakten auch nachgewiesen werden (Baumert *et al.*, 1985). Eine Aktivierung von Anthranilat zu Anthraniloil-CoA ist aus Bakterien bekannt und eine korrespondierende Anthraniloil-CoA Ligase konnte erfolgreich aus Bakterien kloniert werden (Altenschmidt *et al.*, 1991; Altenschmidt und Fuchs, 1992). Dieser Sachverhalt in Bakterien würde für eine Aktivierung von Anthranilat vor einer nachfolgenden Methylierung des Anthraniloil-CoAs sprechen. Für die Acridonbiosynthese in *Ruta graveolens* wurde jedoch nachgewiesen, dass die an der nachfolgenden Kondensationsreaktion beteiligte Acridonsynthase (ACS) eine um etwa das 10-fach höhere Substratspezifität für *N*-Methylantraniloil-CoA als für Anthraniloil-CoA besitzt (Baumert *et al.*, 1993; Schreiner, 2004). Dieser Sachverhalt spricht folglich für eine Aktivierung von *N*-Methylantranilat, wobei ein Nebenweg durch die Aktivierung auf Stufe von Anthranilat nicht ausgeschlossen werden kann. Bisher scheint der Hauptweg der Acridonbildung durch Aktivierung von *N*-Methylantranilat am wahrscheinlichsten (Gröger, 1988; Baumert *et al.*, 1985).

Erste Reinigungsversuche zur Isolierung einer für die Aktivierungsreaktion spezifischen CoA Ligase aus *Ruta graveolens* wurden bereits unternommen (Baumert *et al.*, unveröffentlicht).

Acridonsynthase (ACS)

N-Methylantraniloil-CoA wird mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu 1,3-Dihydroxy-*N*-methylacridon (DMA; Abb. 3) zyklisiert und kondensiert, wie experimentell bestätigt wurde (Baumert und Gröger, 1985; Maier *et al.*, 1993). Die verantwortliche Acridonsynthase (ACS) benötigt keinerlei Kofaktoren und die relative Masse des Enzyms wurde mit 69 kDa im nativen und ca. 40 kDa im denaturierten Zustand bestimmt (Baumert *et al.*, 1994). Partielle Peptidsequenzen zeigten 76 % Ähnlichkeit zur Chalkonsynthase 3 aus der Gartenbohne. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die ACS kloniert (Junghanns *et al.*, 1995). Vergleiche des vollständig translatierten ACS-Polypeptids mit verschiedenen Chalkon- und Stilbensynthasen (CHS und STS) bewiesen schließlich die Zuordnung zur Enzymklasse der Polyketidsynthasen (PKS).

2001 gelang es Lukačín *et al.* durch den Austausch von drei Aminosäureresten die ACS in eine funktionelle CHS zu transformieren. Dieses Ergebnis läßt vermuten, dass sich die ACS aus der CHS entwickelt hat.

Weitere Biosyntheseschritte

1,3-Dihydroxy-*N*-methylnacridon kann als „Muttersubstanz“ für eine Vielfalt weiterer Acridonalkaloide betrachtet werden (Gröger, 1988), allerdings fehlen dazu ausreichende *in vitro* Untersuchungen.

Immerhin konnten aus Inkubationen von *Ruta*-Mikrosomen mit Dimethylallylpyrophosphat Glycocitrin-II und Rutacridon als Endprodukte identifiziert werden (Maier *et al.*, 1990; Maier *et al.*, 1993). Für die Reaktion war NADPH notwendig und die Aktivität konnte durch den Zusatz von Mg^{2+} oder Mn^{2+} gesteigert werden. Vermutlich entsteht also Glycocitrin-II durch Prenylierung von DMA, das anschließend zum Rutacridon zyklisiert (Abb. 7). Die Zyklisierungsreaktion wird wahrscheinlich durch ein Cytochrom P450-abhängiges Enzym katalysiert, da eine Hemmung mit spezifischen Inhibitoren nachweisbar war, allerdings ist die Zyklisierung *in vitro* noch zu beweisen (Maier *et al.*, 1993).

Die Abspaltung der C3-Seitenkette von Rutacridon zu Furofolin-I (Furacridon) konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Maier *et al.*, 1993).

Der Ablauf der Acridonalkaloidbiosynthese einschließlich putativer Biosyntheseschritte kann der Abb. 7 entnommen werden.

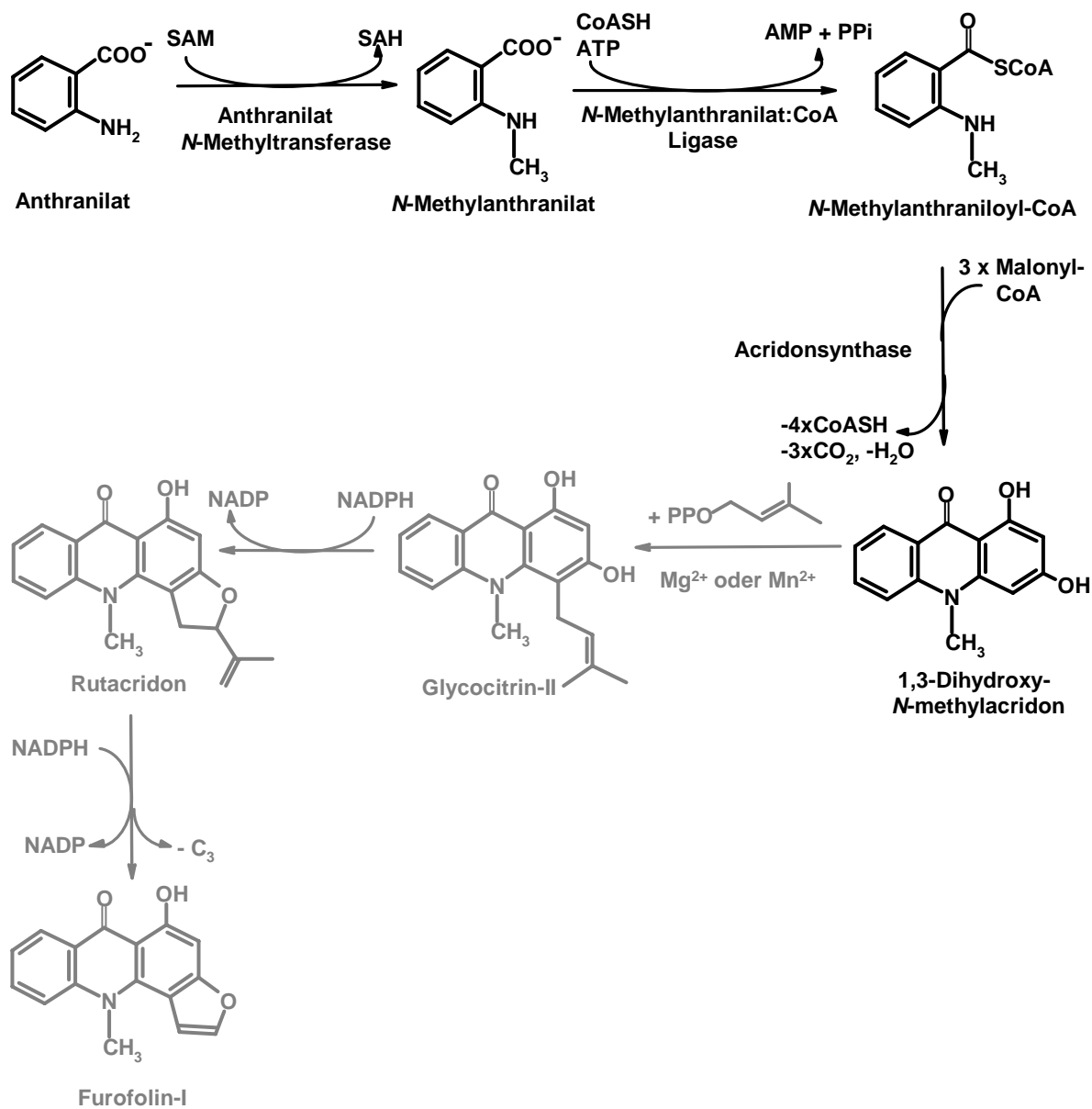


Abb. 7: Schema zur Biosynthese der Acridonalkaloide in *Ruta graveolens* (die enzymatisch noch nicht dokumentierten Schritte sind grau dargestellt)

A. 4 Methyltransferasen (MTn)

Methyltransferasen (MTn) sind in allen Organismen verbreitet und werden nach Methyl donor und Akzeptor unterschieden. Meist dient *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM) als Donor, dessen Methylgruppe aufgrund ihrer positiven Partialladung leicht nukleophil angegriffen werden kann (Schubert *et al.*, 2003), wobei *S*-Adenosyl-L-homocystein (SAH) freigesetzt wird. Bei den Akzeptoren handelt es sich überwiegend um Proteine, Nukleinsäuren oder kleinere Moleküle, in denen unterschiedliche Zielatome (C, O, N oder S) methyliert werden (Martin and McMillan, 2002).

Eine Methylierung kann die physikalischen Eigenschaften des Akzeptors, aber auch seine Stabilität gegenüber abbauenden Enzymen verändern. So kann z.B. eine *O*-Methylierung die reaktiven Hydroxylgruppen von Flavonoiden inaktivieren, wodurch deren mutagenes Potential abgeschwächt wird (Gauthier *et al.*, 1998). Aber auch ihre Löslichkeit und die intrazelluläre Kompartimentierung werden dadurch beeinflusst (Ibrahim *et al.*, 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit werden überwiegend nur charakteristische pflanzliche MTn näher beleuchtet.

A. 4.1 Pflanzliche Methyltransferasen

Pflanzliche Methyltransferasen (MTn) werden in zwei Klassen eingeteilt. Bei Klasse I handelt es sich um Proteine mit einem M_r von 23 bis 27 kDa, die Mg^{2+} für ihre katalytische Aktivität benötigen. Diese Klasse I stellt die Mehrheit der pflanzlichen MTn. Klasse II besitzt ein M_r von 38 bis 43 kDa und ist von Mg^{2+} unabhängig (Ibrahim und Muzac, 2000).

A. 4.1.1 *O*-Methyltransferasen (OMTn)

Die Klasse der *O*-Methyltransferasen (OMTn) ist die am besten untersuchte und bedeutendste innerhalb der pflanzlichen MTn. Bisher konnte eine Vielzahl an Enzymen dieser Klasse isoliert und charakterisiert werden, die unterschiedliche Substrate methylieren (Ibrahim und Muzac, 2000).

In der Literatur bestehen zwei unterschiedliche Prinzipien für die Klassifizierung von OMTn. Ibrahim *et al.* (1998) teilen die OMTn in fünf Gruppen, ausgerichtet nach dem methylierten Akzeptormolekül, ein. In Gruppe A werden alle OMTn gruppiert, die Phenylpropanoide als Akzeptor methylieren. So gehören z.B. die Kaffeeat/5-Hydroxyferulat-OMTn (COMTn) zu dieser Gruppe. Die COMTn sind an der Ligninbiosynthese beteiligt und methylieren neben Kaffeeat und 5-Hydroxyferulat bevorzugt deren Aldehyd- und Alkoholderivate (Dixon *et al.*,

2001). Im Zusammenhang mit der Ligninbiosynthese sind auch die Kaffeoyle-CoA OMTn (CCoAOMT) von Bedeutung, da diese für die Methylierung von Kaffeoyle-CoA zu Feruloyle-CoA und 5-Hydroxyferuloyle-CoA zu Sinapoyle-CoA verantwortlich sind (Roje, 2006). Diese Multifunktionalität der COMTn und CCoAOMTn bietet eine Vielzahl möglicher Reaktionswege zur Bildung der G- und S-Untereinheiten von Lignin. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte jedoch eine genaue Reaktionsabfolge noch nicht eindeutig geklärt werden (Dixon *et al.*, 2001).

In Gruppe B sind OMTn klassifiziert, die die Hydroxylgruppen von Flavonoiden methylieren, wozu z.B. die Chalkon- und Isoflavon-OMT aus *Medicago sativa* zählen. Bei diesen beiden Enzymen handelt es sich um die ersten beiden pflanzlichen OMTn für die erstmals eine Kristallstruktur ermittelt werden konnte (Zubieta *et al.*, 2001). Der Gruppe C werden OMTn zugeordnet, die Alkaloide wie z.B. Benzylisochinin oder Morphin als Substrat akzeptieren. Als Weiteres besteht Gruppe D, in die alle OMTn eingeordnet werden, bei deren Substraten es sich um aliphatische Methylakzeptoren handelt, wie z.B. Inositol oder Galakturonsäure.

Durch die Entdeckung der sogenannten Carboxyl-OMTn ist zur Einteilung von Ibrahim *et al.* (1998) eine weitere Klasse von OMTn hinzugekommen (Roje, 2006). Als Methylakzeptor dienen die Carboxylgruppen z.B. von Benzoat, Salicylat oder Jasmonat, wodurch meist flüchtige Methylester entstehen, die als Geruchs- und Aromastoffe für Pflanzen von Bedeutung sind. Als Prototyp der Carboxyl-OMTn gilt die Salicylat-OMT (SAMT) aus *Clarkia breweri*, die als erstes Enzym dieser Gruppe isoliert, charakterisiert und auch kristallographisch untersucht wurde (Ross *et al.*, 1999; Zubieta *et al.*, 2003). Eine Besonderheit der Carboxyl-OMTn liegt in der hohen Sequenzähnlichkeit zu NMTn, die an der Koffeinbiosynthese beteiligt sind (McCarthy und McCarthy, 2007).

In der zweiten möglichen Klassifizierung der OMTn nach Noel *et al.* (2003) werden die OMTn in drei Klassen aufgrund von Sequenzvergleichen und strukturellen Eigenschaften eingeteilt. Die Klasse I der OMTn der Einteilung nach Noel *et al.* (2003) methyliert ausschließlich die Hydroxylgruppen von Verbindungen, die sich von Phenylpropanoiden ableiten. Dazu gehören die Chalkon- und Isoflavon-OMT aus *Medicago sativa*. Die Klasse II besteht aus den CCoAOMTn. In die Klasse III werden die Carboxyl-OMTn gruppiert. Diese Klasse III wird auch als SABATH-Familie bezeichnet, wobei sich der Name aus den drei wichtigsten Genen dieser Familie zusammensetzt (**S**AMT, **B**AMT und **T**heobrominsynthase). Wegen der sequentiellen und strukturellen Ähnlichkeit werden zu dieser Klasse III auch NMTn, die an der Koffeinbiosynthese (wie z.B. die Theobrominsynthase) beteiligt sind, gezählt (D'Auria *et al.*, 2003).

A. 4.1.2 N-Methyltransferasen (NMTn)

Im Gegensatz zur Klasse der OMTn ist bisher nur eine geringe Anzahl an NMTn molekularbiologisch und biochemisch genauer charakterisiert worden. Untereinander weisen die NMTn nur eine geringe Sequenzähnlichkeit auf und methylieren sehr unterschiedliche Substrate.

Die am ersten Schritt der Nikotinalkaloidbiosynthese beteiligte Putrescin-NMT wurde erstmals aus Tabak isoliert (Hibi *et al.*, 1994). Das Enzym ist für die Methylierung von Putrescin verantwortlich und konkurriert dabei mit der Spermidinsynthase. Das durch den Methyltransfer entstehende N-Methylputrescin kann damit in die Biosynthese von Tropan-, Nikotin- und - nach neueren Untersuchungen - von Calysteginalkaloiden eingeleitet werden (Stenzel *et al.*, 2006). Sequenzvergleiche der Putrescin-NMT zeigen eine Identität von bis zu 70 % zu verschiedenen Spermidinsynthasen, was auf eine Evolution der Putrescin-NMT aus diesem Enzymtyp schließen lässt. Die Spermidinsynthase transferiert eine Aminopropylgruppe an das Putrescin, wodurch Spermidin entsteht.

Für die an der Isochinolinalkaloidbiosynthese beteiligte Coclaurin-NMT (CNMT) aus *Coptis japonica* konnte nach Proteinreinigung aus der Pflanze und Sequenzierung des N-Terminus das entsprechende rekombinante Protein isoliert werden (Choi *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2002). Das Enzym methyliert eine große Anzahl an Isochinolinen. Die Sequenz weist nur geringe Ähnlichkeiten zu anderen NMTn auf. Eine Ähnlichkeit von 28 % ist zu einer Phosphoethanolamin-NMT aus *Lycopersicon esculentum* vorhanden (Choi *et al.*, 2002). Durch Screening einer cDNA-Bank unter Verwendung der Coclaurin-NMT aus *Coptis japonica* konnte die Coclaurin-NMT aus *Papaver somniferum* isoliert werden. Beide Enzyme zeigen eine Identität von 63 % zueinander (Facchini und Park, 2003).

Im Zusammenhang mit der Coclaurin-NMT ist auch die Tetrahydroprotoberberin *cis*-NMT zu erwähnen, die erst kürzlich aus *Papaver somniferum* kloniert und charakterisiert werden konnte (Liscombe und Facchini, 2007). Das Enzym katalysiert ebenfalls einen Methylierungsschritt in der Biosynthese von Isochinolinen wobei (*S*)-Stylopin zum (*S*)-*cis*-N-Methylstylopin umgesetzt wird. Es besteht mit 45 und 48 % eine Ähnlichkeit zu der CNMT aus *Coptis japonica* und *Papaver somniferum*.

Viele Pflanzen reichern zur besseren Bewältigung von Salz- und Trockenstress verstärkt osmotisch wirkende Verbindungen in der Zelle an. Es sind zwitterionische Substanzen wie β -

Alanin-Betain oder Prolin-Betain, wodurch der osmotische Druck der Zelle konstant gehalten werden soll (Rathinasabapathi *et al.*, 2000). Aus *Limonium latifolium*, einem Mitglied der stresstoleranten Familie der Plumbaginaceae, konnte eine trifunktionelle NMT kloniert werden, die in drei aufeinanderfolgenden Schritten β -Alanin-Betain synthetisiert (Raman und Rathinasabapathi, 2003). Ausgehend von β -Alanin entsteht zunächst *N*-Methyl β -Alanin und anschließend *N,N*-Dimethyl β -Alanin. Nach einer Reinigung des pflanzlichen Enzyms war die Klonierung mit degenerierten Primern möglich. Aufgrund der Aminosäuresequenz wurde das Enzym einer neuen Klasse von NMTn zugeordnet, die eine evolutionäre Verwandtschaft zu OMTn zeigt.

Bei einem weiteren NMT-Typ, der an einer Verbesserung der Stresstoleranz von Pflanzen durch Synthese osmoprotektiver Verbindungen beteiligt ist, handelt es sich um die Phosphoethanolamin-NMT. Die cDNA dieser NMT konnte bereits aus Weizen und Spinat isoliert werden (Charron *et al.*, 2002; Nuccio *et al.*, 2000). Ähnlich der β -Alanin-NMT ist die Phosphoethanolamin-NMT vermutlich ebenfalls ein trifunktionelles Enzym, das für die Synthese von Cholin ausgehend von Phosphoethanolamin verantwortlich ist.

Ein weiteres Beispiel für eine NMT ist ein bifunktionelles Enzym aus *Hordeum vulgare* L., das an der Biosynthese von Gramin beteiligt ist. Es katalysiert die Bildung von 3-Aminomethylindol und *N*-Methyl-3-Aminomethylindol. Das Enzym wurde zunächst als Kaffeat-OMT klassifiziert, allerdings nur basierend auf Sequenzanalogien (Lee *et al.*, 1997). Untersuchungen des rekombinanten Klons zeigten mit Kaffeat jedoch keinen Umsatz, allerdings mit Substraten aus der Graminbiosynthese (Larsson *et al.*, 2006).

Besondere Beachtung finden drei NMTn, die an der Biosynthese von Koffein bzw. von Purinalkaloiden beteiligt sind. Die Koffeinbiosynthese konnte bisher am besten in Kaffee- und Teepflanzen untersucht und einige der daran beteiligten Enzyme isoliert werden (Ashihara und Crozier, 2001). Diese sind jedoch sehr labil, wodurch eine Untersuchung erschwert wird.

An der Synthese von Koffein aus Xanthosin sind drei Methylierungsschritte beteiligt. Die erste Methylierung führt von Xanthosin zu 7-Methylxanthosin (Ashihara und Crozier, 2001) und wird durch die 7-Methylxanthosinsynthase (MXS) katalysiert. Nach Hydrolyse der Ribose wird das dabei entstandene 7-Methylxanthin zu Theobromin (3,7-Dimethylxanthin) methyliert, das durch erneute Methylierung zum Koffein umgesetzt wird. Anscheinend gibt es je nach Pflanzenart und Gewebe verschiedene Möglichkeiten für die Enzyme, die die letzten

beiden Methylierungen katalysieren. Aus Blättern von *Camellia sinensis* wurde die Koffeinsynthase (CS) isoliert. Dabei handelt es sich um ein bifunktionelles Enzym, das in Teeblättern für die Methylierung von 7-Methylxanthin über Theobromin zu Koffein zuständig ist (Kato *et al.*, 2000). In Kaffeeepflanzen sind für die letzten beiden Methylierungsschritte zum Koffein vermutlich zwei jeweils für den entsprechenden Schritt spezifische Enzyme vorhanden (Uefuji *et al.*, 2003). Ganz eindeutig bestätigt ist dieses Ergebnis bisher noch nicht. Eine Besonderheit der NMTn, die an der Koffeinbiosynthese beteiligt sind, ist ihre Verbindung zur Familie der Carboxyl-MTn (McCarthy und McCarthy, 2007). So weist z.B. die Koffeinsynthase aus *Camellia sinensis* nur geringe Ähnlichkeit zu O-, N-, und SMTn auf. Mit 41,2 % ist jedoch eine relativ hohe Identität zu einer Salicylat-Carboxylmethyltransferase gegeben (Ashihara und Crozier, 2001). Die Klonierung dieser an der Biosynthese von Koffein beteiligten Methyltransferasen eröffnet eine neue Möglichkeit zur Gewinnung von koffeinfreiem Kaffee oder Tee durch die Verwendung transgener Pflanzen (Ashihara und Crozier, 2001). Erste Versuche wurden bereits erfolgreich durchgeführt (Ogita *et al.*, 2004).

Die bisher isolierten NMTn zeigen nur eine begrenzte bis keinerlei Ähnlichkeit zu den OMTn. Ein einheitliches Schema oder Sequenzmotive zwischen NMTn und OMTn sind nicht erkennbar, was eine Isolation von NMTn erschwert.

A. 4.1.3 Weitere pflanzliche SAM-abhängige MTn

Es gibt noch eine Reihe weiterer pflanzlicher MTn, die unterschiedliche Zielatome und -moleküle, nicht nur des sekundären Metabolismus, methylieren. Diese sind jedoch bisher kaum charakterisiert.

Die Gruppe der C-Methyltransferasen (CMTn) methyliert sehr unterschiedliche Moleküle von Steroiden, Tocopherolen oder Coenzym Q (Ubichinon). Die Enzyme sind überwiegend im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Ibrahim und Muzac, 2000).

Selen stellt ein wichtiges Element für die meisten Organismen dar, das jedoch in höheren Dosen auch toxisch wirkt. Die Kontamination von Böden und Wasser mit Selen ist weltweit ein großes Problem. Durch die Methylierung von Selen-Verbindungen entstehen zumeist flüchtige Endprodukte, die weitaus geringere toxische Eigenschaften besitzen. Die Methylierung von Selen wird ebenfalls durch eine Gruppe von MTn katalysiert (Tagmount *et al.*, 2002).

Eine weitere wichtige Gruppe stellen die *S*-Methyltransferasen (SMTn) dar.

So konnten bereits SMTn z.B. aus *Wollastonia biflora* und *Hordeum vulgare* isoliert werden (James *et al.*, 1995; Pimenta *et al.*, 1998). Diese SMTn katalysieren die Synthese von *S*-Methyl-L-methionin aus L-Methionin oder *S*-Adenosyl-L-Methionin. Im Gegensatz zu anderen MTn, die normalerweise ein M_r von 20-45 kDa zeigen, scheint es sich bei beiden SMTn um Homotetramere mit einer Untereinheitengröße von 115 kDa zu handeln.

Es gibt außerdem eine Gruppe von MTn, die verschiedene Thiolsubstrate nutzen. *N*- oder *O*-Äquivalente von Thiolen sind jedoch keine Substrate. Eine Abgrenzung der Thiolumethyltransferasen zu den SMTn ist dadurch gegeben, dass sie weder Methionin noch Homocystein methylieren (Attieh *et al.*, 2000; Attieh *et al.*, 2002). Klonierte cDNA Sequenzen von Thiolumethyltransferasen aus *Brassica oleracea* weisen die spezifischen Motive für MTn auf, es ist aber keine signifikante Sequenzähnlichkeit mit diesen feststellbar. Auch eine *O*- oder *N*-Methyltransferaseaktivität konnte für diese Enzyme nicht nachgewiesen werden, wodurch sie ebenfalls von diesen bekannten pflanzlichen MTn abzugrenzen sind (Attieh *et al.*, 2002). Außerdem scheinen die Thiolumethyltransferasen Monomere von ca. 25 kDa zu bilden. In der Pflanze sind sie vermutlich an der Methylierung hydrolysierten Glucosinolate beteiligt, die als Abwehrstoffe dienen. Attieh *et al.* (1995) isolierten eine putative Halid/Bisulfid-MT. Nachfolgend wurde jedoch nachgewiesen, dass es sich um eine Thiolumethyltransferase handelt. Die Methylierung von Haliden und Bisulfiden durch diese Enzyme scheint eine zusätzliche Nebenaktivität mit geringer Bedeutung zu sein (Attieh *et al.* 2000).

Ein neuerer, jedoch eher ungewöhnlicher SMT-Typ wurde von Coiner *et al.* (2006) aus *Catharanthus roseus* isoliert. Dieses Enzym besitzt 56-58 % Identität zu Kaffeat-OMTn. Das rekombinante Enzym methyliert Dithiothreitol (DTT). Die *in vivo* Bedeutung des Enzyms und dessen echtes endogenes Substrat in der Pflanze sind bisher noch unbekannt.

Ebenfalls in diesem Zusammenhang zu erwähnen ist ein Enzym, das aus *Ruta graveolens*-Zellsuspensionskulturen isoliert wurde (Burga *et al.*, 2005). Bei den Hauptsubstraten, die durch die Methoxybenzen-OMT methyliert werden, handelt es sich um methoxylierte Phenole wie 3,5 -Dimethoxyphenol. Deswegen ist wahrscheinlich eine Funktion in der Biosynthese von flüchtigen Geruchsverbindungen gegeben. In Anwesenheit von Zink findet durch das Enzym aber auch eine Methylierung von DTT statt. Dieser Funktion konnte aber bisher keine physiologische Bedeutung zugeordnet werden.

Auch die Betrachtung weiterer verschiedener MT-Klassen neben den NMTn und OMTn zeigt deutlich, dass eine Identifizierung eines einheitlichen Schemas der Ähnlichkeit für alle MT-Klassen nicht möglich ist. Wegen dieser Unheitlichkeit ist eine Isolierung der RgANMT, wie für diese Arbeit angestrebt, sicherlich erschwert.

A. 4.2 Konservierte Sequenzmotive

Ausgehend von der Überlegung, dass SAM-abhängige MTn eine sehr ähnliche Bindungsstelle für den Methylonor besitzen müssen, versuchten Kagan und Clarke (1994) erstmals konservierte Sequenzmotive in solchen Methyltransferasen zu identifizieren (Tab. 2). Sie verglichen MTn aus verschiedenen Organismen und konnten drei Bereiche (Motiv I-III) mit hoher Ähnlichkeit feststellen, denen sie putativ die Bindung von SAM zuwies. Die Motive sind jeweils in vergleichbarem Abstand in den Enzymsequenzen angeordnet. Außerdem können diese Bereiche auch in anderen Enzymklassen gefunden werden, die ebenfalls SAM als Substrat nutzen.

In einer weiteren umfassenden Untersuchung aller damals bekannten pflanzlichen SAM-abhängigen MTn durch Joshi und Chiang (1998) wurden in den meisten Sequenzen drei konservierte Bereiche (A-C) gefunden (Tab. 2). Motiv A und B ähneln den Motiven I und II nach Kagan und Clarke (1994). Das dritte Motiv der beiden Untersuchungen ist jedoch völlig unterschiedlich. Anscheinend sind Motiv A und B von Joshi und Chiang (1998) an der SAM-Bindung beteiligt. Zusätzlich zeigen sich auch wieder ähnliche Aminosäureabstände der Motive zueinander, was die Beteiligung an einer SAM-Bindetasche unterstreicht.

Tab. 2: Vergleich der konservierten Sequenzmotive von MTn

Motiv	Kagan und Clark (1994)	Joshi und Chiang (1998)
I/A	(L/I/V)(V/L)(E/D)(V/I)G(C/G)G(P/T)	(V/I/L)(D/K)(V/I)GGxx(G/A)
II/B	(G/P)(T/Q)(A/Y/F)DA(Y/V/I)(I/F)(L/V/C)	(V/I/F)(A/P/E)(x(A/P/G)DAxxxK(W/Y/F)
III/C	LL(K/R)PGG(L/I/R)(I/L)(V/I/F/L)(V/L/I)	(A/P/G/S)(L/I/V)(A/P/G/S)xx(A/P/G/S)(K/R)(V/I)(E/I)(L/I/V)

Wegen der großen Anzahl an OMTn bei diesen Vergleichen fand zusätzlich eine Suche nach spezifischen Sequenzmotiven für diese Gruppe statt (Joshi und Chiang, 1998). Neben den allgemeinen Motiven (A-C) scheint es OMT-Unterfamilien mit zusätzlichen substratspezifischen Motiven zu geben. In der Familie OMT-I, die ausschließlich Kaffeoyl- und Hydroxyferuloyl-CoA Ester methyliert, sind fünf zusätzliche Motive (D-H) konserviert. Für die Familie OMT-II, die eine breite Substratspezifität besitzt, waren vier zusätzliche

Motive (I-L) identifizierbar, die zumindest in 75 % aller verglichenen OMTn vorhanden waren.

Ibrahim *et al.* (1998) identifizierten bei Sequenzvergleichen pflanzlicher OMTn fünf hoch konservierte Bereiche (I-V) im C-terminalen Abschnitt (Abb. 8). Durch Vergleiche mit der Kristallstruktur der Catechol-OMT aus Ratte konnten die Motiv I und IV der SAM- und Metallbindung zugewiesen werden. Alle fünf Bereiche sind mit kleinen Unterschieden auch in nicht-pflanzlichen MTn vertreten, obwohl die Ähnlichkeit dieser Enzymsequenzen zu den pflanzlichen MTn mit 20-25 % nicht sehr hoch liegt.

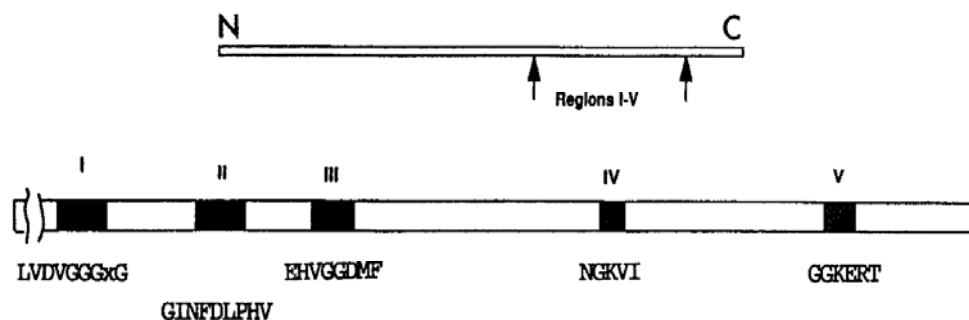


Abb. 8: Relative Lage der konservierten Motive (I-V) im OMT-Peptid.
Sequenzen der Konsensusmotive nach Ibrahim *et al.* (1998)

Die konservierten Bereiche sind nützlich, um putative MTn durch Sequenzvergleiche zu identifizieren. Darüber hinaus wurde in jüngerer Zeit versucht, durch Analyse der Aminosäuresequenz Aussagen über die Substratspezifität zu machen (Schröder *et al.*, 2002). Allerdings liefern Sequenzähnlichkeiten höchstens erste Anhaltspunkte für eine mögliche Substratspezifität.

A. 4.3 Kristallstruktur und Methylierungsmechanismus pflanzlicher MTn

Eine wichtige Technik zur Aufklärung der Proteinstruktur ist die Röntgenbeugung. Sie ermöglicht die Beschreibung von Struktur-Funktionsbeziehungen von Enzymen nach Co-Kristallisation mit Substraten oder die Ableitung katalytischer Mechanismen. Auch mit SAM-abhängigen MTn wurden solche Untersuchungen durchgeführt. Die erste SAM-abhängige MT, die kristallisiert werden konnte, war die Catechol-OMT aus Ratte (Vidgren *et al.*, 1994). Offenbar besitzen alle MTn eine ähnliche räumliche Faltung, obwohl die Polypeptidsequenzen oft nur geringe Ähnlichkeiten untereinander aufweisen. Diese Struktur wurde von Schluckebier und Mitarbeitern (1995) zum ersten Mal beschrieben.

In weiteren Untersuchungen konnten bisher fünf verschiedene Klassen von SAM-abhängigen MTn unterschieden werden (Schubert *et al.*, 2003). Die Mehrheit aller SAM-MTn gehört zur

Klasse I, so auch die pflanzlichen MTn (Martin und McMillan, 2002; Schubert *et al.*, 2003). Die Klasse I besitzt eine Grundstruktur, die ein β -Faltblatt aus sieben β -Strängen umfaßt, zwischen die alternierend sechs α -Helices eingeschoben sind, so dass eine $\alpha\beta\alpha$ -Struktur entsteht. Der siebte β -Strang weist dabei eine antiparallele Anordnung auf. Die Struktur der Klasse I MTn leitet sich höchstwahrscheinlich von einer Rossmann-Faltungsdomäne ab (Schubert *et al.*, 2003; Zubieta *et al.*, 2001).

Pflanzliche SAM-abhängige MTn wurden erstmals von Zubieta *et al.* (2001) kristallisiert und katalytisch wichtige Aminosäurereste identifiziert. Es handelte sich dabei um die Chalkon-OMT (ChOMT) und die Isoflavon-OMT (IOMT) aus *Medicago sativa*. Beide OMTn liegen, anders als die bis dahin kristallisierten MTn, als Dimere in Lösung vor, was vermutlich essentiell für ihre Aktivität und Substratbindung ist. Ihre Struktur unterscheidet sich durch zusätzliche Einschübe innerhalb der allgemeine Grundstruktur der Klasse I MTn (Martin und McMillan, 2002).

Sie besitzen neben einer großen C-terminalen katalytischen Domäne für die SAM- und Substratbindung eine kleinere N-terminale Domäne, die an der Dimerisierung der beiden Untereinheiten beteiligt ist. Diese zusätzliche zweite Domäne, die für die Dimerisierung verantwortlich ist, scheint das Charakteristikum pflanzlicher MTn zu sein (Zubieta *et al.*, 2002).

Der Reaktionsmechanismus der Methylierung läuft wahrscheinlich über eine Deprotonierung der zu methylierenden Hydroxylgruppe unter Hilfe eines Histidinrestes (His278) als Base ab. Dann folgt ein nukleophiler Angriff des Substratanions auf die positiv polarisierte Methylgruppe des SAMs, was durch die Anwesenheit von zwei Glutamatresten (Glu306 und Glu337) unterstützt wird, die den Histidinrest flankieren (Zubieta *et al.*, 2001; Abb. 38).

Außerdem scheinen zwei Methioninreste (Met168 und Met311) im aktiven Zentrum wichtig zu sein, durch welche die optimale Positionierung des Substrates hin zum SAM für die Methylierung ermöglicht wird. Dies scheint zumindest nach Kristallisationsstudien für die IOMT und ChOMT aus *Medicago sativa* entscheidend zu sein (Zubieta *et al.*, 2001). Wegen der hohen Konservierung dieser beiden Methylreste ist dies vermutlich auch für andere OMTn gegeben, die hydroxylierte Phenylgruppen methylieren.

Ebenfalls aus *Medicago sativa* konnten später auch die Kaffeoyl-Coenzym A 3-O-Methyltransferase (CCoAOMT) und die Kaffeat/5-Hydroxyferulat 3/5-O-Methyltransferase (COMT) kristallisiert werden (Ferrer *et al.*, 2005; Zubieta *et al.*, 2002). Die tertiäre und quartäre Struktur der COMT ist ähnlich zu der von ChOMT und IOMT, wobei hier allerdings

ein größeres aktives Zentrum die Umsetzung unterschiedlicher Substrate erlaubt (Zubieta *et al.*, 2002).

Die CCoAOMT gehört sowohl strukturell als auch mechanistisch zu einer eigenen Gruppe pflanzlicher OMTn (Ferrer *et al.*, 2005). Die CCoAOMT besitzt keine N-terminale Domäne, die zur Dimerisierung beiträgt. Im nativen Zustand liegt das Enzym jedoch ebenfalls als Dimer vor. Außerdem scheint die Dimerisierung nicht notwendig für eine katalytische Aktivität der CCoAOMT zu sein, da die Kofaktoren und Substrate nur mit je einem Monomer interagieren. Im Gegensatz dazu ist bei ChOMT, IOMT und COMT die N-terminale Domäne eines Monomers ein Teil des aktiven Zentrums des anderen Monomers.

Die Katalyse der CCoAOMT scheint im Vergleich zu den anderen bisher kristallisierten pflanzlichen MTn ebenfalls anders abzulaufen. Durch ein Metallion erfolgt zunächst die Deprotonierung der Kaffeoyl 3-Hydroxylgruppe, die dann die nukleophile Methylgruppe des in der Nähe befindlichen SAMs angreift (Ferrer *et al.*, 2005).

Die Aussagekraft von Kristallstrukturen lässt sich an der Chavicol-OMT und der Eugenol-OMT aus *Basilikum* deutlich zeigen (Gang *et al.*, 2002). Die beiden Sequenzen weisen eine 90-%ige Identität auf Aminosäureebene zueinander auf. Mit den Daten für ChOMT und IOMT aus *Medicago sativa* (Zubieta *et al.*, 2001) wurden Homologiemodelle für die beiden Enzyme erstellt. Anhand dieser Modelle wurde postuliert, dass die Substratspezifität von einer einzigen Aminosäure abhängig ist und der Austausch dieser Aminosäure konnte die Substratspezifitäten der Chavicol- und Eugenol-OMTs ineinander überführen.

Auch die Salicylat-Carboxymethyltransferase (SAMT) aus *Clarkia breweri* als Vertreter der Carboxymethyltransferasen konnte kristallisiert werden (Zubieta *et al.*, 2003). Ähnlich wie bei der CCoAOMT sind auch bei der SAMT aus *C. breweri* die katalytischen Zentren der beiden Monomere getrennt und unabhängig voneinander. Im Falle der SAMT ist keine Deprotonierung erforderlich, sondern nur die Ausrichtung auf SAM.

Ein weiterer Schritt zur Aufklärung der unterschiedlichen Typen von MTn ist auch die erste Kristallisation von zwei NMTn, die an der Koffeinbiosynthese beteiligt sind und zur selben MT-Klasse zählen wie die Carboxymethyltransferasen (McCarthy und McCarthy, 2007). So sind dabei die Bindung von SAM/SAH sowie des Substrates und der Ablauf des Methyltransfers sehr ähnlich, was die nahe Verwandtschaft der Enzymgruppen unterstreicht.

A. 4.4 Zielsetzung

Über die Biosynthese von Acridonalkaloiden sowie deren Bedeutung für die Pflanze ist nur wenig bekannt. Acridonalkaloide finden sich nur in einer kleinen Anzahl von Pflanzenfamilien wieder, was sie zusätzlich interessant macht. Für einige Acridone konnte zudem ein antikanzerogenes Potential nachgewiesen werden (Gröger, 1988).

Die an der Acridonbiosynthese in *Ruta graveolens* L. beteiligte S-Adenosyl-L-methionin:Anthranilat N-Methyltransferase (ANMT) katalysiert die N-Methylierung von Anthranilat, wodurch dieses der Bildung von L-Tryptophan im primären Stoffwechsel entzogen wird. Das Enzym wurde von Maier *et al.* (1995) bereits partiell aus *Ruta* gereinigt und vorläufig charakterisiert, jedoch fand die Reinigung nicht bis zur Homogenität statt. Unter der Annahme einer ausgeprägten Sequenzähnlichkeit mit bekannten OMTn wurde versucht, Oligonukleotid-Primer, abgeleitet aus konservierten MT-Motiven, für die cDNA-Klonierung der RgANMT einzusetzen (Burga, 2005). Auch dieser Versuch der ANMT-Isolierung führte nicht zum Erfolg.

Bei dieser Sachlage blieb daher nur ein erneuter Versuch einer konventionellen Reinigung der RgANMT mit anschließender Mikrosequenzierung, um spezifische, degenerierte Primer für die cDNA-Amplifizierung ableiten zu können.

Eine folgende rekombinante Expression der ANMT sollte dann eine biochemische Charakterisierung ermöglichen. Dies wäre insbesondere im Hinblick auf Untersuchungen zur Substratspezifität notwendig. Die präparative Gewinnung des Enzyms sollte zur Gewinnung von Antiserum eingesetzt werden, welches dann in Kombination mit spezifischen DNA-Sonden zur Kontrolle der gewebespezifischen Expression eingesetzt werden kann. Außerdem kann rekombinant homogenes Enzym für eine Kristallisation dienen, um Struktur- und Bindestudien durchzuführen.

Eine Isolation der ANMT würde die Möglichkeit eines Vergleiches der Primärsequenz und der räumlichen Struktur mit bekannten OMTn und NMTn bieten, was neue Einblicke in die Evolution von MTn eröffnet und einen Beitrag zur Aufklärung der Acridonbiosynthese leisten würde.

B. Material

B. 1 Chemikalien und Hilfsmittel

Acrylamid	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
SeaKem LE Agarose	Cambrex Bio Science (Rochland, USA)
Select Agar	Invitrogen (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
dNTP-Set (100 mM)	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Gene Ruler 1 kDa DNA Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Guanidiniumthiocyanat	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Duchefa Biochemie (Haarlem, NL)
Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)
Micro-Agar	Duchefa Biochemie (Haarlem, NL)
Pepton	Duchefa Biochemie (Haarlem, NL)
Roti®-Phenol/Chloroform	Roth (Karlsruhe)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Trypton	Duchefa Biochemie (Haarlem, NL)
X-Gal	Roth (Karlsruhe)

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von Merck, Sigma, Roth oder Serva bezogen.

B. 2 Radiochemikalien

S-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]-methionin
(52 mCi/mmol)

Hartmann (Braunschweig)

B. 3 Substrate

Anthranilat (2-Aminobenzoat)

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

N-Methylantranilat

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

3-Aminobenzoat

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

4-Aminobenzoat

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Anthranilsäuremethylester

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

N-Methylantranilsäure-methylester

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2-Amino-3-methoxybenzoat

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2-Aminobenzylalkohol

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2-Aminobenzamid

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

3-Hydroxyanthranilat

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Nikotinsäure

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Salicylat (2-Hydroxybenzoat)

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

ACC (1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure)

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Kaffee

Roth (Karlsruhe)

Quercetin

Roth (Karlsruhe)

Eugenol

Roth (Karlsruhe)

Benzoat

Roth (Karlsruhe)

Phloroglucinol

Fluka AG (Buchs, Schweiz)

Catechol/Brenzcatechin

Roth (Karlsruhe)

Theobromin

Roth (Karlsruhe)

Xanthin

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Theophyllin

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Theobromin

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Putrescin (1,4-Diaminobutan-Dihydrochlorid)

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Bergapton

Extrasynthese (Genay, Frankreich)

Anthraniloyl-CoA

V. De Luca (Brock Universität,
Department of Biological Science,
St. Catharines, Kanada)

B. 4 Enzyme

Pfu DNA Polymerase

MBI Fermentas (St. Leon Rot)

Restriktionsendonukleasen

MBI Fermentas (St. Leon Rot)

T4 DNA Ligase

MBI Fermentas (St. Leon Rot)

Terminale Desoxynukleotid Transferase

MBI Fermentas (St. Leon Rot)

RevertAidTM H Minus M-MuLV RT

MBI Fermentas (St. Leon Rot)

RNase

MBI Fermentas (St. Leon Rot)

B. 5 Proteine und Antiseren

Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Alkoholdehydrogenase	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dalton Mark VII-L Proteinmarker (SDS-7)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas (St. Leon Roth)
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V	Roth (Karlsruhe)
Anti-Rabbit-IgG aus Ziege gekoppelt an alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Antiseren aus Kaninchen gegen Anthranilat	Nano-Tools (Teningen)
N-Methyltransferase (ANMT)	

B. 6 Kommerzielle Reaktionsansätze (Kits) und sonstiges Verbrauchsmaterial

Gel Filtration LMW Calibration Kit	Amersham Bioscience (Freiburg)
Nucleo Spin® Extract II	Macherey-Nagel (Düren)
pET Directional TOPO Expression Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Silver Stain Plus	Bio-Rad (München)
Ni-NTA His-Bind® Superflow	Novagen (Darmstadt)
Amicon Bioseparations Centricon YM-10	Millipore Corporation (Bedford, USA)
Concert Plant RNA Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)

B. 7 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
TOP 10®	F ⁻ mrcAΔ(mmr-hsdRMS-mcrBC) Θ80lac ZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara- leu)7697 galU galK rps (Str ^r) endA1 nupG	Invitrogen (Karlsruhe)
BL21 Star™ (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm rne131 (DE3)	Invitrogen (Karlsruhe)

B. 8 Vektoren

Bezeichnung	Hersteller
pTZ57R	MBI Fermentas (St. Leon Roth)
pET15b	Novagen (Darmstadt)
pET101	Invitrogen (Karlsruhe)

(Vektorkarten pTZ57R und pET15b siehe Anhang)

B. 9 Puffer und Lösungen

B. 9.1 Pflanzenzellkulturen

Zellextraktionspuffer für Proteinreinigung:

100 mM Tris-HCl (pH 7,5)

1 mM EDTA

2 mM DTT

10 % (v/v) Glycerin

10 % (w/v) Polyclar

B. 9.2 SDS-PAGE

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)

10 x Laufpuffer:

0,25 M Tris-HCl

1 M Glycin

35 mM SDS

Coomassie-Färbelösung:

45 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

Entfärbelösung:

40 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

Coomassie-Färbelösung für Proteinsequenzierung:

0,15 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

0,5 % (v/v) Essigsäure

10 % (v/v) Methanol

Entfärbelösung für Proteinsequenzierung:

0,5 % (v/v) Essigsäure

10 % (v/v) Methanol

B. 9.3 Agarose-Gelelektrophorese

50 x TAE-Puffer:

2 M Tris

5,71 % (v/v) Essigsäure

50 mM EDTA

B. 9.4 RNA Isolierung

RNA-Extraktionspuffer (Giuliano *et al.* 1993):

4,23 M Guanidinthiocyanat

0,225 M Natriumacetat, pH 5,3

7 mM N-Lauroylsarcosine

B. 9.5 Herstellung kompetenter Zellen

Lösung I:
100 mM MgCl_2

Lösung II:
100 mM CaCl_2
15 % (v/v) Glycerin

B. 9.6 Plasmid-DNA Isolierung

Lösung I:
50 mM Glukose
25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
10 mM EDTA
Nach dem Autoklavieren werden 0,02 mg/ml RNase zugegeben

Lösung II:
0,18 N NaOH
1 % (w/v) SDS

Lösung III:
29,5 % (v/v) Essigsäure
KOH-Plättchen bis pH 4,8

B. 9.7 FPLC**Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC):**

Äquilibrationpuffer:
100 mM Glycin-NaOH (pH 8,9)
1 mM EDTA
2 mM DTT
1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Elutionspuffer:
100 mM Glycin-NaOH (pH 8,9)
1 mM EDTA
2 mM DTT

Größenausschlusschromatographie (GPC):

Für die Enzymreinigung
50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
1 mM EDTA
2 mM DTT

Für die apparente Molekularmasse:
50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
10 mM EDTA
2 mM DTT

Ionenaustauschchromatographie (DEAE):

Äquilibrationpuffer:

50 mM Tris-HCl (pH 7,5)

0,5 mM EDTA

2 mM DTT

Elutionspuffer:

50 mM Tris-HCl (pH 7,5)

0,5 mM EDTA

2 mM DTT

1 M NaCl

Affinitätschromatographie an Adenosin-Agarose:

Äquilibrationpuffer:

50 mM Tris-HCl (pH 8,5)

2 mM DTT

Waschpuffer:

50 mM Tris-HCl (pH 8,5)

2 mM DTT

0,2 M NaCl

Elutionspuffer:

50 mM Tris-HCl (pH 8,5)

2 mM DTT

0,2 M NaCl

2 mM SAM

B. 9.8 Metallchelatchromatographie (IMAC)

Aufschluss- und Bindepuffer:

50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0)

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

Waschpuffer:

50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0)

300 mM NaCl

20 mM Imidazol

Elutionspuffer:

50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0)

300 mM NaCl

250 mM Imidazol

B. 9.9 Puffer für Enzymtest

Kontrolle der Enzymreinigung:
73,5 mM Glycin-NaOH (pH 8,9)

Standardtest:
200 mM Tris-HCl (pH 7,0)

B. 9.10 Puffer für Bakterienaufschluss

70 mM Tris-HCl (pH 7,5)
10 mM EDTA

B. 9.11 Puffer und Lösungen für Western Blot Analyse

Anodenpuffer I:
0,3 M Tris-HCl (pH 10,4)
10 % Methanol (v/v)

Anodenpuffer II:
25 mM Tris-HCl (pH 10,4)
10 % Methanol (v/v)

Kathodenpuffer:
25 mM Tris-HCl (pH 9,4)
10 % Methanol (v/v)
40 mM Aminohexansäure

TBS-Puffer:
100 mM Tris-HCl (pH 7,5)
150 mM NaCl

TTBS (TBS-Waschpuffer):
100 mM Tris-HCl (pH 7,5)
150 mM NaCl
0,05 % (v/v) Tween-20

Alkalische Phosphatase Substratpuffer:
100 mM Tris-HCl (pH 9,5)
150 mM NaCl
50 mM MgCl₂

B. 10 DC-Platten und Laufmittel

Ethanol	Konz. Ammoniak	Wasser
80	4	16

Cellulose F Platten 20x20 cm (Nr. 1.05718)

Merck (Darmstadt)

B. 11 Säulenmaterialien

PD-10 Entsalzungssäulen	Amersham Bioscience (Freiburg)
Fractogel EMD Propyl 650 (S)	Merck (Darmstadt)
Fractogel EMD BioSEC	Merck (Darmstadt)
Fractogel DEAE 650 (S)	Merck (Darmstadt)
Partikelgröße 20-40 µm	
Adenosin 5'-Monophosphat Agarose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

B. 12 Medien

M20 (pH 5,6 bis 5,8; in 1 l H ₂ O dest.):	20 ml Stammlösung 1
	20 ml Stammlösung 2
	20 ml Stammlösung 3
	1 ml Vitamine
	30 g Saccharose

Stammlösung 1 (in 1 l H₂O dest.):

Makroelemente:	NH ₄ NO ₃	82,5 g
	KNO ₃	95,0 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	18,5 g
	KH ₂ PO ₄	8,5 g
Mikroelemente:	H ₃ BO ₃	31 mg
	MnSO ₄ x H ₂ O	1,12 g
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	430 mg
	KJ	41,5 mg
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	12,5 mg
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	1,25 mg
	CaCl ₂ x 6 H ₂ O	1,25 mg

Stammlösung 2 (in 1 l H₂O dest.):

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	22,0 g
--	--------

Stammlösung 3 (in 1 l H₂O dest.):

Na ₂ EDTA	1866 mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1390 mg

Vitamine (in 1 ml H₂O dest.):

Nicotinsäureamid	0,5 mg
Thiaminhydrochlorid	0,1 mg
Pyridoxinhydrochlorid	0,1 mg
Calciumpanthotenat	50 mg
myo-Inosit	80 mg

LB-Medium (Luria Bertani; pH 7,5):

Pepton aus Casein (w/v)	1 %
Hefeextrakt (w/v)	1 %
NaCl	171 mM
MgSO ₄	4 mM
Glycerin (v/v)	0,2 %

SOC-Medium:

Bactotrypton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	8,6 mM
Glukose	20 mM

B. 13 Geräte

Mastercycler gradient 5331
Spektrophotometer UV-1602
Ultraschallprozessor UP 200 S
Sorvall RC-5C Plus
Sorvall RMC 14
Heraeus Biofuge pico
Thermomixer 5436
Fast Protein Liquid Chromatography Anlage
PAGE-Apperatur: Miniprotean II Multicell
Elektrophorese Power Supply EPS 3500 XL
1214 Rackbeta Szintillationszähler
Bio Imager FLA-2000

Ultra Turrax® T25 basic
Western-Blot Apparatur Sammy Dry
LaChrom HPLC-System
Modell D-7000 HSM
bestehend aus den Modulen:
DAD L 4500
UV-Detektor L 4250
Interface D 6000
Pumpen L 6200A
Autosampler AS 4000 A

Eppendorf (Hamburg)
Shimadzu Europa (Duisburg)
Dr. Hielscher (Teltow)
DuPont (Newtown, Connecticut, USA)
DuPont (Newtown, Connecticut, USA)
Kendro (Hanau)
Eppendorf (Hamburg)
Pharmacia (Freiburg)
Bio-Rad (München)
Pharmacia (Freiburg)
PerkinElmer (Wellesley, USA)
Fuji Photo Film (Tokyo, Japan)
Software von Raytest (Straubenhardt)
IKA Labortechnik (Staufen)
Schleicher & Schuell (Dassel)
Merck/Hitachi (Darmstadt)

C. Methoden

C. 1 Pflanzenmaterial

C. 1.1 *Ruta graveolens* Pflanzen

Für Untersuchungen am Pflanzenmaterial wurde eine zweijährige *Ruta graveolens* Pflanze aus der Gärtnerei des Instituts für Pharmazeutische Biologie (Leitung: Herr W. Rudl) verwendet. Nach der Ernte wurden die Gewebe (Blätter, Blüten, Stängel und Wurzeln), die für eine spätere RNA-Extraktion dienten, direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

C. 1.2 Zellsuspensionskulturen

C. 1.2.1 Kultivierung

Die Kalluskulturen wurden in flüssigem M20-Medium (B. 9.1) unter ständigem Schütteln (110 rpm) und einer konstanten Raumtemperatur von 25 °C im Dunkeln kultiviert. Zur Erhaltung der Kultur erfolgte im wöchentlichen Rhythmus eine Überführung von 4 g Kallusmaterial in einen 250 ml Erlenmeyerkolben mit 40 ml neuem Medium. Zusätzlich fand eine Kultivierung auf festem M20-Medium (80 ml M20-Medium mit 0,8 % (w/v) Micro-Agar) statt, wobei etwa alle vier Wochen ein Umsetzen auf frisches Medium notwendig war. Für die unter Punkt C. 1.2.2.2 beschriebene Induktion wurden etwa 40 g Kallusausgangsmaterial in 400 ml Medium in einem 2 l Erlenmeyerkolben über einen Zeitraum von 10 Tagen vermehrt.

C. 1.2.2 Induktion

Als Ausgangsmaterial für alle Induktionen diente die *Ruta graveolens* Zellkulturlinie R-20 (Baumert *et al.*, 1982). Die Induktion der Zellen wurde bei 25 °C im Dunkeln unter ständigem Schütteln (110 rpm) durchgeführt.

C. 1.2.2.1 Induktion für RNA-Extraktion

Die Induktion der *Ruta graveolens* Zellsuspensionskultur fand durch die Zugabe von 5 mg rohe Zellwandfraktionen des zuvor sterilisierten Elizitors *Phytophthora sojae* (früher *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*; Pmg) gelöst in 1 ml H_2O dest. je 40 ml Kulturmedium statt. Die Induktionsdauer der 6 Tage alten Kulturen betrug 0 bis 7 h.

C. 1.2.2.2 Induktion für Proteinextraktion

Die Induktion der Zellkultur wurde durch die Zugabe von 1 % (w/v) sterilem Hefeextrakt zur 10 Tage alten 400 ml Kultur ausgelöst. Nach einer Induktionsdauer von 16 ½ h fand die Ernte der Zellen für die Proteinreinigung statt.

Zur Messung der Induzierbarkeit der ANMT wurde eine Zeitreihe erstellt. Dazu wurden aus 2 Kolben einer 400 ml induzierten Zellkultur nach 0/2/4/6/8/12/15/18 und 24 h jeweils etwa 2,5 g Zellmaterial entnommen, vereinigt und geerntet.

C. 1.2.3 Ernte

Die Ernte der induzierten Zellen erfolgte unter Verwendung einer Vakuumpumpe und einer Glasfilternutsche durch Absaugen des Mediums. Danach wurden die Zellen zusätzlich mit etwa 300 ml H₂O dest. gewaschen und schließlich nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

C. 2 Molekularbiologische Methoden

C. 2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Für die RT-PCR wurde Gesamt-RNA mit dem Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln einer zweijährigen *Ruta graveolens* Pflanze entsprechend der Anleitung des Herstellers isoliert.

Aus *Ruta*-Zellkulturen wurde die Gesamt-RNA in Anlehnung an Giuliano *et al.* (1993) extrahiert, wie im folgenden näher beschrieben.

In ein 1,5 ml fassendes Reaktionsgefäß wurden 500 µl Extraktionspuffer (B. 9.4), 3,5 µl 2-Mercaptoethanol (0,7 % v/v) und 400 µl mit Citrat-Puffer äquilibriertes Phenol einpipettiert und auf Eis zwischengelagert. 200 mg des induzierten Zellmaterials (C. 1.2.2.1) wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zerkleinert und das Pulver anschließend in die vorbereiteten Reaktionsgefäße überführt. Ein anschließendes weiteres Mischen bewirkte eine weitere Homogenisierung. Durch die Zugabe von 100 µl Chloroform und eine Inkubation für 20 min auf Eis konnten Proteine gefällt werden. Nach einer Zentrifugation bei 10 000 x g für 20 min bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung von Nukleinsäuren wurde dem Überstand Isopropanol im Verhältnis 1:1 beigemischt und für 60 min auf Eis belassen. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min mit 10 000 x g bei 4 °C, wobei der Überstand verworfen wurde. Das erhaltene Präzipitat wurde auf Eis in 500 µl sterilem Wasser wieder resuspendiert. Anschließend wurden 100 µl Ethanol

(100 %) und nach 20 min auf Eis noch 1/3 Volumen an 8 M LiCl zugesetzt. Nach weiteren 60 min auf Eis und einer Zentrifugation (20 min, 10 000 rpm, 4 °C) wurde das Präzipitat zweimalig mit 80-%igem Ethanol gewaschen. Nach einer ausreichenden Trocknung des Sediments wurde dieses in 30 µl steriles Wasser wieder aufgenommen. Das Ergebnis der RNA-Extraktion wurde über Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Bei einer erfolgreichen Extraktion zeigten sich stets die charakteristischen Banden für die 18S und 28S ribosomalen RNAs.

C. 2.2 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren dienten 1,5 % (w/v) TAE-Agarosegele. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte die Auftrennung der Nukleinsäuren unter Verwendung von 1 x TAE-Puffer als Laufpuffer und Anlegung einer Spannung von 100 V. Die Nukleinsäuren konnten später aufgrund der Einlagerung von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

C. 2.3 Gehaltsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Gehaltsbestimmung von Nukleinsäuren wurde auf zwei Arten durchgeführt.

Zunächst erfolgte eine Auftrennung der Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese. Zur Bestimmung der Konzentration diente der zusätzlich aufgetragene Eco λ-Marker (MBI Fermentas) als Vergleichsstandard, der Größenbanden mit definierten DNA-Konzentrationen enthält, wodurch visuell die enthaltene Menge an Nukleinsäuren abgeschätzt werden konnte.

Eine weitere Möglichkeit der Gehaltsbestimmung war durch Messung der Absorption bei 260 nm gegeben. Doppelstrang-DNA ergibt eine A_{260} von 1 bei einer Konzentration von 50 µg DNA/ml in Wasser. Das zusätzlich ermittelte Verhältnis A_{260}/A_{280} gibt Aufschluss über Kontaminationen mit Proteinen. Der A_{260}/A_{280} -Quotient von DNA-Lösungen sollte mindestens 1,8 betragen.

C. 2.4 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Unter sterilen Bedingungen wurde je nach Zweck 1 µl einer entsprechenden *E. coli* Bakterienkultur in 5 ml LB-Medium einpipettiert und über Nacht kultiviert (37 °C, 220 rpm). 1 ml der Übernachtskultur wurde in 100 ml LB-Medium überführt und der Ansatz bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bis 0,6 inkubiert (37 °C, 220 rpm). Dann erfolgte eine Zentrifugation für 10 min mit 3 800 x g bei 4 °C, wonach der Überstand verworfen und das Präzipitat in 20 ml eiskalter Lösung I (B. 9.5) wieder aufgenommen wurde. Darauf folgte eine

30-minütige Lagerung auf Eis. Nach einer Zentrifugation (10 min, 2 500 x g, 4 °C) wurde das Sediment in 2 ml eiskalter Lösung II (B. 9.5) gelöst. Jeweils 150 µl wurden in bereits vorgekühlten Reaktionsgefäßen aliquotiert, schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

C. 2.5 Reverse Transkription

Die reverse Transkription (RT) wurde unter Verwendung der RevertAidTM H Minus M-MuLV-Reversen Transkriptase der Firma MBI Fermentas (St. Leon Rot) durchgeführt.

Der Ansatz für die reverse Transkription enthielt neben 5 µg Gesamt-RNA 1 µl einer 25 pM oligo-(dT)-Anchorprimer(AP)-Lösung (siehe Tab. 3) und steriles Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 11 µl. Der Gesamtansatz wurde anschließend für 5 min bei 70 °C inkubiert. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis wurden 4 µl des zugehörigen 5x Reaktionspuffers, sowie 2 µl einer 10 mM dNTP-Lösung und steriles Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 19 µl hinzupipettiert. Der Ansatz wurde dann für 5 min bei 37 °C gehalten. Zum Schluss wurde die Reverse Transkriptase (1µl, 200 U) hinzugegeben und der Ansatz 60 min lang im Wasserbad bei 42 °C inkubiert. Danach war eine Lagerung der hergestellten cDNA bei –20 °C möglich.

C. 2.6 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

C. 2.6.1 Synthese von Oligonukleotiden

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) oder Sigma-Genosys (Steinheim) bezogen und auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt. In Tab. 3 findet sich eine Zusammenstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Primer mit Namen und Darstellung der Sequenz.

Tab. 3: Nukleotidsequenz aller in dieser Arbeit verwendeten Primer

Bezeichnung	Basensequenz (5'-...-3')	Orientierung
Metdg_gb1h	GC(AGCT)CC(AGCT)GT(AGCT)ATG(CT)T(AGCT)GA(CT)(AC)G	vorwärts
Metdg_gb2	TT(AG)AA(AGCT)GG(AGCT)A(AG)(AGCT)CC(AGCT)CC(CT) TC(AG)AA(AGCT)AC	rückwärts
MetFor15b	GGAATTCCATATGGGTTCTTTATCG	vorwärts
MetRev15b	CAGGATCCTACTTGAAGAACTCC	rückwärts
MetR5'_1LD	GACCAGAAACGGAGCAATCAAGC	rückwärts
MetR5'_2 GNFMALP	GGGCAACGCCATGAAGTTACC	rückwärts
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTACT(T) _{24 oder 16}	rückwärts
oligo-(dT)- AP	(TTT) ₁₀ (CG)(AGCT)	rückwärts
AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIIGGGIIG	vorwärts
18SrRNAfor	AGGAATTGACGGAAGGGCAC	vorwärts
18SrRNArev	GCACATCTAAGGGCATCACA	rückwärts
MetExpFor	CACCATGGGTTCTTTATCGGAATCC	vorwärts
MetExpRev	CTACTTGAAGAACTCCATGATTGTGG	rückwärts

C. 2.6.2 ANMT-spezifische PCR

Die PCR erfolgte mit degenerierten Primern, die basierend auf den Ergebnissen der MALDI-TOF Sequenzierung erstellt wurden. Die Inkubationen (Gesamtvolumen 50 µl) enthielten 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 U Taq-Polymerase, 1 x Polymerasepuffer und jeweils 3 µM der Primer Metdg_Pgb1h (Forward-Primer) und Metdg_Pgb2 (Reverse-Primer). Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tab. 3 aufgeführt.

Außerdem befand sich im Ansatz 1 µl der hergestellten cDNA (0,4 bis 0,8 µg) und bis zum Gesamtvolumen von 50 µl die entsprechende Menge an sterilem Wasser. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem Mastercycler-Gerät der Firma Eppendorf mit folgendem Programmablauf:

1 x	95 °C für 5 min	Denaturierung
39 x	95 °C für 30 s	Denaturierung
	Temperaturgradient (45, 50, 55 °C) für 1 min	Annealing
	72 °C für 2 min	Extension
1 x	72 °C für 5 min	Extension

Der Gesamtansatz wurde zunächst auf Eis gehalten. Zum Starten der Reaktion wurde die Taq-Polymerase zugegeben, alles in das bereits vortemperierte PCR-Gerät gestellt und das Programm gestartet. Um die optimalen Temperaturbedingungen für die Primer zu finden, wurde ein Temperaturgradient von 45 °C, 50 °C und 55 °C angewendet. Das Ergebnis wurde

nachfolgend mit Agarosegelen überprüft und Fragmente der gesuchten Basenpaargröße mit Hilfe der überhängenden A-Enden in den pTZ57R-Vektor (MBI Fermentas, St. Leon Roth) kloniert.

C. 2.6.3 RACE (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds)

Verschiedene Methoden der schnellen Amplifikation von cDNA-Enden nach Frohman *et al.* (1988) dienen der Vervollständigung der DNA-Sequenz. Als Ausgangsmaterial wurde die unter C. 2.5 hergestellte cDNA verwendet. Für die PCR wurde das unter C. 2.6.2 verwendete Programm genutzt.

C. 2.6.3.1 3'-RACE

In einem Gesamtansatz von 50 µl befanden sich 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 U *Taq*-Polymerase, 1 x Reaktionspuffer sowie je 3 µM des Primers Metdg_Pgb1h und 0,5 µM des oligo-(dT)-AP-Primers (Tab. 3). Für die zugehörige PCR fand das bereits unter C. 2.6.2 genutzte Programm Verwendung. Das Ergebnis wurde mit Agarosegelen überprüft und Proben mit der erwarteten Bandengröße in den pTZ57R-Vektor kloniert. Nach Plasmidpräparation war eine Sequenzierung möglich.

C. 2.6.3.2 5'-RACE

Zunächst war eine Synthese von cDNA notwendig, wie bereits unter C. 2.5 beschrieben, jedoch unter Verwendung eines teilsequenzspezifischen Primers (MetR5'_2GNFMALP) statt des ansonsten verwendeten oligo-dT-AP. Für die weitere Bearbeitung der cDNA musste diese von Verunreinigungen wie Nukleotiden unter Verwendung des NucleoSpin II Kit (Macherey Nagel) befreit werden. Als nächstes erfolgte ein „C-“ und „A-tailing“ des 5'-Endes. Dies fand unter Verwendung einer Terminalen Deoxynukleotidyl Transferase entsprechend den Herstellerangaben (MBI Fermentas, St. Leon Roth) statt.

In einer PCR wurden beide Tailingansätze zusammen mit entsprechenden konjugierenden Primern (Abridged Adapter Primer (AAP) für das „C-tailing“ und oligo-d(T)-Anchor Primer (oligo-d(T)-AP) oder Anchorprimer (AP) für das „A-tailing“) sowie eines teilsequenzspezifischen Primers [MetR5'_1LD] verwendet.

Der PCR-Ansatz enthielt 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 2,5 U *Taq*-Polymerase und jeweils 2 µM der entsprechenden Primer. Der PCR-Programmablauf entsprach dem des 3'-RACE. Fragmente der gewünschten Größe wurden subkloniert und sequenziert.

C. 2.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

Um ein Verhältnis von Vektor zu Insert von 3:1 zu gewährleisten, wurde entsprechend der folgenden Formel die notwendige einzusetzende DNA-Menge für die Ligation berechnet:

$$\frac{3 * 16,5 \text{ ng} * \text{Länge des Fragmentes}}{\text{Länge des Vektors}}$$

Die Klonierungen erfolgten, mit Ausnahme von Expressionsversuchen, in den pTZ57R-Vektor der Firma MBI Fermentas. Die Länge des Vektors beträgt nach Herstellerangaben und es wurde stets eine Menge von 16,5 ng pTZ57R-Vektor eingesetzt. Eine Ligation der PCR-Produkte in den Vektor war aufgrund der überhängenden A-Enden möglich. Zu 1 µl Vektor ($\approx 16,5$ ng) wurde die entsprechend berechnete Menge an DNA hinzugegeben und mit H₂O dest. auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Danach wurden noch 2 µl PEG 4000 (50-%ige-Lösung (w/v)) sowie 1 x T4-Ligationspuffer zugegeben und alles bis auf 20 µl mit H₂O dest. aufgefüllt. Zum Schluss folgte die Zugabe von 5 U Ligase und der Ansatz wurde über Nacht bei 22 °C im Wasserbad inkubiert.

C. 2.8 Transformation kompetenter Bakterienzellen

5 µl des unter C. 2.7 hergestellten Ligationsansatzes wurden zu 150 µl kompetenten Bakterienzellen gegeben und für 30 min auf Eis belassen. Anschließend folgte eine Inkubation bei 42 °C für 30 s und eine Zugabe von 250 µl SOC-Medium. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 30 min unter ständigem Schütteln, wurden 50 bis 100 µl der transformierten Zellen auf LB-Ampicillin-Platten (Konzentration Amp 100 µg/ml) ausgestrichen, auf denen zuvor 40 µl X-Gal Lösung (Konzentration 8 mg/200 µl DMF) aufgetragen worden war. Mittels des Blau/Weiß-Screenings war es möglich, die Zellen, die das gesuchte Insert enthielten, zu isolieren und in LB-Medium zu überführen. Die weitere Bearbeitung fand wie unter C. 2.9 beschrieben statt.

C. 2.9 Plasmid-DNA Isolierung (Alkalische Lyse)

Etwa 1,4 ml einer über Nacht kultivierten Bakterienlösung wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, die Bakterien bei 10 000 x g für 5 min zentrifugiert und das erhaltene Sediment in 100 µl Lösung I (B. 9.6) durch Mischen wieder gelöst. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II (B. 9.6) und leichtem Mischen, erfolgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis, um die Bakterien zu lysieren. Durch das Einpipettieren von 150 µl Lösung III (B. 9.6) und anschließender Lagerung auf Eis für 5 min wurden Proteine gefällt. Der nach der

Zentrifugation bei 10 000 x g für 10 min bei 4 °C erhaltene Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt und 1 ml 100-%iger Ethanol hinzugegeben. Der Ansatz wurde kurz gemischt und dann für 2 min auf Eis gehalten. Die so gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (10 000 x g, 5 min, 4 °C) sedimentiert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 500 µl Ethanol (70 %). Die gefällte Plasmid-DNA wurde nach ausreichendem Trocknen für mindestens 5 min in 30 bis 50 µl sterilem H₂O dest. resuspendiert. Es war dann eine Lagerung bei – 20 °C möglich. Die Analyse der DNA fand per Restriktionsverdau und Agarosegel statt. Die Sequenzierung der im Klonierungsvektor pTZ57R enthaltenen DNA-Fragmente erfolgte durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg).

C. 2.10 Gelelution

Zur Gelelution wurde das NucleoSpin Extract II Kit von Macherey & Nagel verwendet. Dazu wurden nach einer Gelelektrophorese Banden mit den gesuchten Größen aus dem Gel ausgeschnitten und entsprechend der Herstellerangaben weiter bearbeitet.

C. 2.11 Heterologe Expression

C. 2.11.1 Expressionsspezifische PCR

Für eine Klonierung der vollständigen kodierenden Sequenz der RgANMT in den Expressionsvektor wurden spezielle Primer verwendet. Durch diese wurde der Sequenz vor dem ATG-Startcodon eine *NdeI*-Schnittstelle und am 3'-flankierenden Ende eine *BamHI*-Schnittstelle eingefügt, was später die direktionale Klonierung der cDNA-Sequenz entsprechend der Sense-Richtung in den Vektor ermöglichte. Die PCR wurde mit 0,2 mM dNTP, 2 mM MgSO₄ sowie je 2 µM der expressionsspezifischen Primer und 2,5 U *Pfu*-Polymerase in einem Gesamtansatz von 50 µl durchgeführt. Als Template diente cDNA. Die *Pfu*-Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon Roth) wurde verwendet, um eine möglichst geringe Fehlerrate zu garantieren.

Als PCR-Programm dienten die folgende Zyklusparameter:

1 x 95 °C	für 5 min
39 x 95 °C	für 30 s
50 °C	für 1 min
72 °C	für 2 ½ min
1 x 72 °C	für 10 min

4 PCR-Ansätze wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und Produkte auf der gesuchten Höhe aus dem Gel mittels NucleoSpin Extract II Kit eluiert und gereinigt. Damit erfolgte dann ein Restriktionsverdau wie unter Punkt C. 2.11.2 beschrieben.

C. 2.11.2 Restriktionsverdau

Da die notwendigen Restriktionsenzyme vor allem an den Enden von DNA-Strängen nur eine geringe Aktivität zeigten, musste eine spezielle Inkubation angewendet werden. Zunächst wurden 25 µl DNA-Probe mit 0,5 µl *NdeI* und zugehörigem Puffer nach Herstellerangaben über Nacht für 20 h inkubiert und dann noch für weitere 3 h 0,5 µl *BamHI* zugegeben. Nach dem Restriktionsverdau wurde der Ansatz wiederum mit dem NucleoSpin Extract II Kit gereinigt.

C. 2.11.3 Klonierung in den Expressionsvektor

5,5 µl des unter C. 2.11.2 hergestellten Produktes wurde mit 5 µl geschnittenem pET15b-Vektor, 4 µl Ligase (20 U; MBI Fermentas, St. Leon Roth), 2,5 µl Ligasepuffer sowie 8 µl H₂O dest. über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der bereits vorgeschchnittene Vektor pET15b wurde freundlicherweise von Frau Verena Janiak (Institut für Pharmazeutische Biologie, Philipps-Universität Marburg) bereitgestellt.

Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde zu 150 µl kompetenter Zellen (TOP 10[®]) gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 45 s bei 42 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend 250 µl SOC-Medium hinzugegeben. Die transformierten Zellen wurden auf Agaroseplatten (LB-Medium, Amp (100 µg/ml)) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach folgte eine Plasmidpräparation, sowie eine Überprüfung der Ligation durch Restriktions- und Sequenzanalyse.

C. 2.11.4 Transformation in BL21-Zellen

Die Expression des rekombinanten Enzymes lief im Expressionssystem pET15b/BL21Star[™] (DE3) ab. Die Transformation der BL 21 Zellen fand wie unter C. 2.8 beschrieben statt. Dazu dienten 5 µl der unter C. 2.11.3 erhaltenen Plasmid-DNA zur Transformation in die BL21-Zellen.

C. 2.11.5 Induktion transformierter BL21-Zellen

4 ml einer Übernachtskultur der unter C. 2.11.4 entsprechend transformierten Zellen wurden in 400 ml LB-Medium (Konzentration Amp 100 µg/ml) überführt und bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0,7-0,8 wachsen gelassen. Die Induktion der Bakterienzellen fand durch 1 mM IPTG für 4 h statt. Nach dem Ernten der Zellen durch Zentrifugation (3 000 x g, 10 min, 4°C) konnten diese bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert werden.

C. 2.11.6 Aufschluss induzierter BL21-Zellen

Das Pellet eines 400 ml Ansatzes wurde in 6 ml Puffer (B. 9.10) resuspendiert, durch Ultraschall (3 x 30 s, Amplitude 100 %) auf Eis aufgeschlossen und Zelltrümmer abzentrifugiert (20 000 x g, 4 °C, 10 min).

C. 2.12 Semiquantitative Reverse Transkriptase PCR

Für Untersuchungen von Transkriptmengen der *RgANMT* in der Pflanze wurde eine sogenannte Reverse Transkriptase PCR durchgeführt. Nach Isolation von Gesamt-RNA aus entsprechenden Pflanzenteilen (C. 2.1) wurden je 5 µg für die cDNA-Synthese eingesetzt wie bereits unter C. 2.5 beschrieben. In einer weiterführenden PCR wurde in einem Ansatz von je 50 µl Gesamtvolumen 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 U *Taq*-Polymerase, 1 x Polymerasepuffer, jeweils 3 µM der Primer MetExpFor und MetExpRev (Tab. 3) sowie 1 µl aus unterschiedlichen Gewebe (Blätter, Blüten, Stängel und Wurzeln) hergestellte cDNA für eine Amplifikation der *RgANMT* im PCR-Gerät inkubiert.

Als Kontrolle zur Überprüfung, ob für jedes verwendete Gewebe auch gleiche Mengen an Gesamt-RNA eingesetzt wurden, dienten parallel dazu PCR-Ansätze mit Primern zur Amplifikation der 18S rRNA. Die Sequenzen der entsprechenden Primer kann der Tab. 3 entnommen werden. Der genaue Programmablauf ist im Folgen dargestellt:

1 x	95 °C für 5 min	Denaturierung
15, 25 und 35 x	95 °C für 30 s	Denaturierung
	53 °C für MetExpFor und MetExpRev bzw.	
	60 °C für 18S rRNAfor und 18S rRNArev	
	für 1 min	Annealing
	72 °C für 2 min	Extension

Zur Untersuchung der Ergebnisse wurden anschließend je 15 µl der Proben mittels 1,5 % Agarosegel aufgetrennt und unter UV ausgewertet.

C. 3 Biochemische Methoden

C. 3.1 Rohextraktgewinnung

Die Pflanzenzellen wurden unter langsamer Zugabe der 2,5-fachen Menge an Puffer B. 9.1 in einem Mörser zerkleinert. Zusätzlich erfolgte danach eine weitere Homogenisierung des Zellmaterials unter Verwendung eines Ultra Turrax® Homogenisators für 2 mal 3 min bei 16 000 rpm. Nach Zentrifugation mit 20 000 x g für 20 min (4 °C) fand der Überstand für die weitere Bearbeitung Verwendung.

C. 3.2 Fraktionierende Ammoniumsulfatfällung

Der Überstand von C. 3.1 wurde einer Ammoniumsulfatfraktionierung unterzogen. Unter leichtem Rühren auf Eis wurde die jeweils notwendige Menge an Ammoniumsulfat dem Überstand nach und nach zugeführt und danach noch für mindestens 30 min weiter gerührt. Durch Zentrifugation bei 20 000 x g für 20 min konnte das ausgefällte Protein von der flüssigen Phase abgetrennt werden.

Das aus dem Überstand im Bereich von 30-50 % Ammoniumsulfatsättigung gefällte Protein wurde in Puffer für die hydrophobe Interaktionschromatographie gelöst, wobei das aus 10 g Ausgangsmaterial gefällte Protein in 1 ml Puffer aufgenommen wurde.

Zur Überprüfung der Enzymaktivität wurde von jedem Überstand 1 ml zur Durchführung von Enzymtests abgenommen. Die Durchführung des Enzymtests für die Reinigung der ANMT aus den Pflanzenzellen ist unter C. 3.8.2.1 beschrieben.

C. 3.3 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

C. 3.3.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte in modifizierter Form nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951; Sandermann und Strominger, 1972; Bensadoun und Weinstein, 1976). Dazu wurde das Protein mit 24-%iger Trichloressigsäure in Gegenwart von Natriumdesoxycholat gefällt. Rinderserumalbumin (BSA) in einer Menge von 5 bis 40 µg diente dabei als Standard.

C. 3.3.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Miniprotean-II Apparatur (Bio-Rad, München).

Trenngel [12,2 %]

4100 µl	Acrylamid (30 %)
2500 µl	Trenngelpuffer (B. 9.2.)
400 µl	10 % (w/v) SDS
3000 µl	H ₂ O dest.
16 µl	TEMED
70 µl	10 % (w/v) APS

Sammelgel [4,5 %]

375 µl	Acrylamid (30 %)
100 µl	10 % (w/v) SDS
625 µl	Sammelgelpuffer (B. 9.2.)
1400 µl	H ₂ O dest.
5 µl	TEMED
20 µl	10 % (w/v) APS

Zuerst wurde das Trenngel gegossen und sofort mit einer Butanol/dest. H₂O-Mischung überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation und Entfernung des Butanol/dest. H₂O-Gemisches konnte das Sammelgel auf das Trenngel aufgebracht werden.

Die Proteinproben wurden in einem Volumen von nicht mehr als 30 µl Gesamtvolumen einschließlich 5 µl SDS-Probenpuffer (B. 9.2) und 10 µl DTT (Stammlösung 8 mg DTT/ml H₂O dest.) für 5 min bei 95 °C denaturiert. Bei einer Überschreitung des maximalen Probenvolumens von 20 µl wurde das Protein durch Zugabe von 24-%iger Trichloressigsäure im Verhältnis 1:1 für 30 min auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation bei 10 000 x g konnte das Präzipitat nach zweimaligem Waschen mit 500 µl eiskaltem Aceton mit anschließendem Trocknen in 10 µl DTT-Stammlösung aufgenommen und wie oben bereits beschrieben weiter bearbeitet werden. Zum Schluss wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 180 V für ca. 1 h aufgetrennt. Anschließend konnten die Proteinbanden durch die Anfärbung mit einer 0,25-%igen Coomassie-Lösung (B. 9.2) und einer nachfolgenden Behandlung mit Entfärbelösung (B. 9.2) sichtbar gemacht werden. Für die Detektion von sehr geringen Proteinmengen wurde das Silver Staining Plus Kit der Firma Bio-Rad entsprechend der beiliegenden Anleitung verwendet.

C. 3.4 FPLC-Reinigung der nativen ANMT

Alle chromatographischen Reinigungsschritte wurden mit einer FPLC-Anlage der Firma Pharmacia durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm und die dazugehörigen Elutionsprofile konnten durch einen elektrischen Schreiber registriert werden. Zur Sammlung von Proteinfractionen diente ein Fraktionskollektor. Die Probeninjektion fand über einen Superloop (Fassungsvolumen 50 ml) oder eine 1 ml fassende Probenschleife statt. Nach jedem FPLC-Lauf wurde die Enzymaktivität der gesammelten Proben überprüft. Die aktiven Fraktionen dienten einer Proteinbestimmung wie unter C. 3.3.1 beschrieben. Danach wurde eine SDS-PAGE mit gleichen Proteinmengen in jeder Probe zum besseren Vergleich durchgeführt.

C. 3.4.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Material: Fractogel EMD Propyl 650 (S) (Merck, Darmstadt)

Säule: Superperformance 16 (Bettvolumen 36 ml)

Die Säule wurde zunächst mit dem Äquilibriumspuffer für die HIC (B. 9.7) gewaschen. Die Beladung der Säule mit etwa 7,5 ml des unter C. 3.2 gewonnenen Proteinextraktes erfolgte unter Verwendung des Superloops. Durch anschließendes Waschen der Säule mit Äquilibriumspuffer wurden ungebundene Proteine entfernt, bis die Basislinie wieder erreicht wurde. Die Elution der an das Säulenmaterial gebundenen Proteine erfolgte durch einen linear abnehmenden Ammoniumsulfatgradienten im Puffer von 1 M bis 0 M. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Das Eluat wurde in Fraktionen von jeweils 1 ml aufgefangen.

C. 3.4.2 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Material: Fractogel EMD BioSEC (Merck, Darmstadt)

Säule: Superperformance 16 (600 x 16 mm, Gelbettvolumen 113,5 ml)

Das Material der Säule besteht aus makroporösem, partikulärem Polymethylacrylat (Partikelgröße 20-40 μm , Porengröße 500-800 Å), das durch die Umsetzung mit Diethylenglykol hydrophilisiert wurde. Die Oberfläche ist mit aufgepfropften Linerpolymeren aus Methoxyethylacrylamid belegt. Der Fraktionierungsbereich der Säule liegt zwischen 5 und 1000 kDa.

Die Säule wurde mit dem drei- bis fünffachen an SEC-Puffer (B. 9.7) des Säulenvolumens voräquiliert. Fraktionen mit den höchsten Enzymaktivitäten aus drei HIC-Trennungen (C. 3.4.1) wurden vereinigt, das Protein mit 80 % Ammoniumsulfat gefällt, durch Zentrifugation bei 20 000 x g für 10 min gesammelt und in 2 ml GPC-Puffer aufgenommen. 100 μl der

Probe dienten für Kontrolluntersuchungen. Die Probe konnte mit einer Flussrate von 1 ml/min mittels Probenschleife auf die Säule gegeben werden. Die Flussrate von 1 ml/min wurde auch für die weitere Chromatographie beibehalten. Die Fraktionen mit der höchsten Enzymaktivität konnten direkt ohne weitere Umpufferung für den nächsten Reinigungsschritt verwendet werden.

C. 3.4.3 Anionenaustauscherchromatographie

Material: Fractogel DEAE 650 (S) (Merck, Darmstadt), Partikelgröße 20-40 μm ;

Säule: Superperformance SF (156 x 26 mm, Bettvolumen 67,5 ml)

Es handelt sich um einen basischen Ionenaustauscher mit funktionellen Diethylaminoethylgruppen ($\text{pK-Wert} > 11$), der zuerst mit dem drei- bis fünffachen des Säulenvolumens an Basispuffer (B. 9.7) äquilibriert wurde. Das Probenvolumen wurde mittels Superloop auf die Säule aufgebracht, und die Säule mit Puffer gewaschen, bis die Absorption wieder die Basislinie erreicht hatte. Eine Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch einen linear zunehmenden Gradienten von 0 bis 1 M NaCl im Puffer. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Es wurden 1,5 ml Fraktionen aufgefangen und Fraktionen mit der höchsten Aktivität für den nächsten Reinigungsschritt verwendet.

C. 3.4.4 Affinitätschromatographie

Material: Adenosin 5'-Monophosphat Agarose (AMP-Agarose) (Sigma A-1271)

Die Vorbehandlung des kommerziellen Säulenmaterials fand in Anlehnung an James *et al.* (1995) und Kato *et al.* (1999) statt. Zunächst musste die AMP-Agarose für 1 h bei Raumtemperatur in 5 ml H_2O dest. unter leichtem Rühren vorquellen. Das Gel wurde in ein leeres PD10-Säulchen (Amersham, Freiburg) gefüllt und nacheinander mit 50 ml 0,5 M NaCl, 50 ml H_2O dest. und 50 ml Tris-HCl (pH 8,5) gewaschen. Dann wurde das Material mit 7 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) in einen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt. Anschließend erfolgte eine Dephosphorylierung durch die Zugabe von zunächst 750 U alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) für 3 h unter leichtem Schütteln bei 30 °C und einer weiteren Zugabe von 750 U mit anschließender Inkubation über Nacht unter den selben Bedingungen. Das so behandelte Material konnte danach bei 4 °C gelagert werden. Nach der Befüllung einer FPLC-Säule mit dem Material musste noch mit 100 ml 0,5 M NaCl und 100 ml H_2O dest. gespült werden. Dazu wurde die befüllte Säule an die FPLC-Anlage angeschlossen.

Für die eigentliche Proteintrennung wurde die Säule zuerst mit dem unter B. 9.7 beschriebenen Äquilibrationpuffer für mindestens 1 h mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min gespült. Die zu verwendenden Fraktionen wurden mittels PD10-Säule in den entsprechenden Puffer (B. 9.7) umgepuffert. Anschließend konnte das Probenvolumen durch den Superloop auf die Säule gegeben werden. Dazu wurde eine Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min für eine gute Bindung der Proteine an das Säulematerial gewählt. Nach Beendigung der Probenauftragung wurden ungebundene Proteine zunächst durch 2 ml des Äquilibrationpuffers und anschließend noch mit 2 ml des unter B. 9.7 beschriebenen Waschpuffers entfernt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit dem Elutionspuffer in Gegenwart von 2 mM SAM. Die Sammlung des eluierten Proteins erfolgte in 0,5 ml Fraktionen. Die Detektion nach SDS-PAGE wurde mit dem Silver Stain Plus Kit (Bio-Rad, München) durchgeführt.

C. 3.5 SDS-Gel für die Mikrosequenzierung

Fraktionen mit deutlicher Aktivität von drei Affinitätstrennungen wurden vereinigt und mit Centricon YM-10 Filtereinheiten (Millipore Corporation, USA) nach Herstelleranleitung konzentriert. Die gesamte Probe wurde durch SDS-PAGE bei 100 V für 2 ½ h aufgetrennt, das Gel in einer speziellen Coomassie-Lösung (B. 9.2) unter leichtem Schütteln bei RT für 5 min gefärbt und sofort in die Entfärbelösung (B. 9.2) überführt. Aus dem Gel wurden dann Banden ausgeschnitten und für die Mikrosequenzierung verwendet.

C. 3.6 Proteinsequenzanalyse (MALDI-TOF)

Die partielle Sequenzierung gereinigter Proteine erfolgte per *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight (MALDI-TOF)* - Massenspektroskopie durch Herrn Dr. Hunziker vom Functional Genomics Center der Universität Zürich. Erste Sequenzvergleiche der Fragmente wurden ebenfalls dort durchgeführt.

C. 3.7 Reinigung der rekombinanten ANMT

C. 3.7.1 Metallchelatchromatographie (IMAC)

Die Zellmasse aus einer 400 ml Bakterienkultur (C. 2.11.5) wurde in 4 ml Bindepuffer (B. 9.8) aufgenommen, der auch gleichzeitig als Aufschlusspuffer diente. Der weitere Aufschluss der Zellen erfolgte nach C. 2.11.6. Die Enzymreinigung erfolgte unter Verwendung des Ni-NTA His-Bind® Superflow Kits nach Anleitung des Herstellers Novagen im Batch-Verfahren in einer leeren PD10-Säule. Zur Überprüfung der Reinigung wurden je 20 µl der

verschiedenen Fraktionen über SDS-PAGE kontrolliert, die entscheidenden Fraktionen vereinigt und über eine PD10-Säule in Puffer B. 9.9 umgepuffert.

C. 3.7.2 Anionenaustauscherchromatographie

Die weitere Reinigung des rekombinanten Proteins durch Ionenaustauscherchromatographie wurde, wie für das native Enzym beschrieben (C. 3.4.3), durchgeführt. Fraktionen mit reinem Enzym wurden über eine PD10-Säule in phosphatgepufferte Saline umgepuffert und für die Herstellung polyklonaler Antikörper (C. 3.13) verwendet.

C. 3.8 Charakterisierung der rekombinanten ANMT

C. 3.8.1 Relative Molmasse

Die SEC-Säule wurde zunächst mit drei Säulenvolumen des Äquilibrationpuffers (B. 9.7) gewaschen und mit Referenzproteinen (Low molecular weight gel filtration kit, Amersham Bioscience, Braunschweig; Alkoholdehydrogenase, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) kalibriert (Tab. 4).

Tab. 4: Proteine zum Größenvergleich bei Ausschlusschromatographie

Protein	Molekulargewicht
Alkoholdehydrogenase	150
Albumin	67
Ovalbumin	43
Chymotrypsinogen A	25
Ribonuclease A	13,7

Das Gelbettvolumen wurde entsprechend der Formel $V_t = 2 \cdot r^2 \cdot H \cdot \pi$ (mit $r=0,8$ cm und $H=56,5$ cm) zu 113,6 ml berechnet. Die Bestimmung des Ausschlussvolumens (37,5 ml; V_o) erfolgte mit Dextranblau 2000 (Amersham Bioscience, Braunschweig). Aus einer induzierten 20 ml Bakterienkultur wurde das bei 30 bis 80 % Ammoniumsulfat fällbare Protein abzentrifugiert (10 min, 20 000 x g), in 1 ml Puffer aufgenommen und bei einer Flussrate von 1 ml/min mit einer Probenschleife auf die Säule gegeben. Das Elutionsvolumen bis zur höchsten Enzymaktivität ergibt das Elutionsvolumen V_e des Proteins. Das apparente Molekulargewicht der rekombinanten ANMT wird dann über den Vergleich der Retentionsvolumina (K_{av} -Werte) von Referenzproteinen bestimmt. Zur Berechnung von K_{av} diente die folgende Formel:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

K_{av} = Verteilungskoeffizient

V_e = Elutionsvolumen des Proteins

V_o = Ausschlussvolumen

V_t = Gelbettvolumen

C. 3.8.2 Biochemische Charakterisierung

C. 3.8.2.1 Kontrolle der ANMT-Reinigung aus Zellkulturen

Extrakte und Fraktionen aus *Ruta*-Zellen wurden mit einem standardisierten Test auf ANMT-Aktivität geprüft. In einem Inkubationsvolumen von 200 µl befanden sich 73,5 mM Glycin-NaOH-Puffer (pH 8,9), 0,3 mM Anthranilat und 37,5 µM [Methyl-¹⁴C]-SAM (51,3 kBq/µmol), sowie 50 µl des jeweiligen Enzymextraktes. Die gesamte Reaktion wurde durch die Zugabe von SAM gestartet und lief bei 32 °C für 30 min ab. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 0,2 N HCl gestoppt und die Produkte mit 200 µl Ethylacetat extrahiert. 100 µl der Ethylacetatphase dienten der Radioaktivitätsmessung in 5 ml Szintillationscocktail (Roth, Karlsruhe) mittels Szintillationszähler (1214 Rackbeta; PerkinElmer, Wellesley, Massachusetts, USA) oder für dünnschichtchromatographische Untersuchungen. Kontrollen wurden ohne Enzym oder mit gekochtem Enzym (95 °C, 5 min) durchgeführt.

C. 3.8.2.2 Enzymtest für die rekombinante ANMT

In einem Volumen von 100 µl wurden die Messungen in 200 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) in Gegenwart von 250 µM Anthranilat sowie 4 µM [Methyl-¹⁴C]-SAM (1,93 MBq/µmol) und 0,05 µg Enzym durchgeführt. Jeder Test erfolgte über einen Zeitraum von 20 min bei 35 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl 0,2 N HCl gestoppt und die Produkte mit 100 µl Ethylacetat extrahiert. Das halbe Volumen diente der Radioaktivitätsmessung in 5 ml Szintillationscocktail (Roth, Karlsruhe) mittels Szintillationszähler oder für dünnschichtchromatographische Untersuchungen.

Für alle Testreihen wurde das partiell mit IMAC gereinigte Enzym verwendet und stets Doppeltests durchgeführt.

C. 3.8.2.3 pH-Abhängigkeit

Die Aktivität des rekombinanten Enzyms wurde in 200 mM Puffern bei 32 °C für 30 min gemessen. Die pH-Bereiche wurden mit folgenden Puffersystemen abgedeckt:

<u>Puffer</u>	<u>pH</u>
Natriumacetat	4,0-5,5
Bis-Tris	6,0-7,0
Tris-HCl	7,0-8,5
Kaliumphosphat	5,0-8,0
Natriumglycinat	6,8-10,0
Britton-Robinson II	4,0-11,0

C. 3.8.2.4 Temperaturabhängigkeit

Die Temperaturabhängigkeit der ANMT-Aktivität wurde in 200 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 bei 15, 20, 25, 28, 32, 35, 40, 45 oder 50 °C für 30 min bestimmt.

C. 3.8.2.5 Zeitlinearität

Die Abhängigkeit des Umsatzes der ANMT von der Inkubationszeit wurde nach ½, 1, 2 ½, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 min in 200 mM Tris-HCl pH 7,5 gemessen wie unter C. 3.8.2.2 beschrieben.

C. 3.8.2.6 Proteinlinearität

Die Abhängigkeit des Umsatzes der ANMT von der Proteinmenge wurde mit 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5 µg in 200 mM Tris-HCl pH 7,5 wie unter C. 3.8.2.2 beschrieben bestimmt.

C. 3.8.2.7 Metallabhängigkeit

Der Einfluss von Metallionen auf die Enzymaktivität wurde mit jeweils 1,5 mM Endkonzentration MgSO₄, CaCl₂, MnCl₂, KCl, NaCl, FeSO₄, Fe₂(SO₄)₃, CuSO₄, CoCl₂ oder ZnCl₂ gemessen. Ansonsten waren die weiteren Bedingungen wie in C. 3.8.2.2 beschrieben. Zusätzlich wurde EDTA in derselben Endkonzentration getestet. Die Ergebnisse wurden mit einer Kontrollinkubation ohne Zugabe von Metallen verglichen.

C. 3.8.2.8 Substratspezifität

Die Substratspezifität wurde mit einer Konzentration von 250 μM des jeweiligen Substrates je 5 μg Enzym, wie unter C. 3.8.2.2 beschrieben, gemessen.

Für Anthraniloyl-CoA als potentiell Substrat wurden die Bedingungen modifiziert, weil CoA-Ester nicht mit Ethylacetat aus der wässrigen Substratlösung extrahierbar sind. Vor der Inkubation wurde die wässrige Substratlösung (25 μl , 400 μM Anthraniloyl-CoA) mit 300 μl Ethylacetat extrahiert, um evtl. Reste von freiem Anthranilat zu entfernen. Dabei extrahiertes freies Anthranilat diente nach Entfernung des Ethylacetats für einen separaten Enzymtest. Aus der Unterphase wurden unter Vakuum Reste von Ethylacetat entfernt und danach die Probe halbiert.

Die eine Hälfte wurde direkt für einen Enzymtest eingesetzt, die andere Hälfte wurde zunächst durch Zugabe von 1 μl 1 N NaOH für 30 min bei Raumtemperatur hydrolysiert, dann mit 0,8 μl 1 N HCl neutralisiert und erst danach für einen Enzymtest verwendet.

C. 3.8.2.9 Stabilität der ANMT

Aliquots des Enzyms wurden über unterschiedliche Zeiträume bei RT, 4 $^{\circ}\text{C}$ oder mit Einfrieren bei -20 $^{\circ}\text{C}$ bzw. -80 $^{\circ}\text{C}$, jeweils auch mit Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff, gelagert.

Das bei Raumtemperatur und 4 $^{\circ}\text{C}$ gelagerte Enzym wurde nach 1, 3, 6, 12, 24, 48 und 98 h auf seine Aktivität hin überprüft. Die Aktivität der eingefrorenen Proben wurde nach 7, 14, 21, 28 Tagen und nach 6 Monaten überprüft.

Außerdem wurde Enzym mehrmals aufeinanderfolgend aufgetaut und wieder eingefroren und dabei jeweils die Aktivität bestimmt.

Alle hier verwendeten Proteinlösungen enthielten 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein in 200 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5.

C. 3.8.2.10 K_m -Wertbestimmungen

Die Bestimmungen für die apparenten K_m -Werte fanden unter optimalen Bedingungen statt, um die Linearität des Testes über die tatsächliche Messzeit hinaus zu gewährleisten. Die Bestimmung des K_m -Wertes für Anthranilat erfolgte bei 100 μM [Methyl- ^{14}C]-SAM (496 kBq/ μmol), während die Konzentration von Anthranilat in einem Bereich von 5 bis 90 μM im Testansatz variierte.

Die Bestimmung des K_m -Wertes von SAM erfolgte in Gegenwart von 250 μM Anthranilat. Die Konzentration an [Methyl- ^{14}C]-SAM (1,93 MBq/ μmol) variierte im Bereich von 0,6 bis 20 μM .

Die Auswertung erfolgte graphisch nach Lineweaver-Burk. Es wurden stets Doppeltests durchgeführt.

C. 3.9 Radioaktivitätsmessungen

Die quantitative Bestimmung der Radioaktivität erfolgte durch Flüssigszintillationszählung (Szintillationszähler 1214 Rackbeta, PerkinElmer, Wellesley, USA) oder durch die Auswertung im Bio Imager FLA-2000 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) mit der dazugehörigen Auswertungssoftware AIDA (Raytest, Straubenhardt).

C. 3.10 Dünnschichtchromatographie

Erste Auswertungen radioaktiver Enzymtests erfolgten durch Dünnschichtchromatographie auf Cellulose F Platten (Merck, 20 x 20 cm) mit Laufmittel (B. 10). Die gut getrockneten Platten wurden mit dem Bio-Imager FLA-2000 ausgewertet und unmarkierte Referenzen wurden unter UV-Bestrahlung lokalisiert.

C. 3.11 HPLC

HPLC-Trennungen erfolgten auf einer C18 Nucleodur Sphinx RP Säule (5 μm , EC 125/4, Macherey-Nagel, Düren) einer HPLC-Anlage D-7000 HSM (Merck, Darmstadt) mit Diode Array Detektor (DAD).

Das Laufmittel orientierte sich an Wang und De Luca (2005) mit 100 % Methanol (Lösungsmittel A) und 0,1 % (v/v) Essigsäure in H_2O dest. (Lösungsmittel B) als flüssige Phase. Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min mit einem Gradienten aus 0-3 min, 10-90% A; 3-10 min, 90 % A; 10-13 min, 90-10 % A; 13-18 min, 10 % A.

Die Enzymaktivität wurde in 100 μl 200 mM Tris-HCl (pH 7,0) in Gegenwart von 7,3 mM Anthranilat und 2,3 mM SAM gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μg Protein gestartet und bei 35 °C für 30 min inkubiert. Danach fand eine Extraktion mit 100 μl Ethylacetat statt. Nach Entfernung des Ethylacetats wurden die Ansätze in 200 μl Methanol wieder aufgenommen und für die HPLC-Untersuchungen verwendet.

C. 3.12 Massenspektroskopische Bestimmung

Nach der Durchführung von mehreren Enzymtests wie unter C. 3.11 beschrieben, wurden die extrahierten Produkte vereinigt und das Ethylacetat entfernt. Die Probe diente dann zur Durchführung von massenspektroskopischen Untersuchungen am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps Universität Marburg unter der Leitung von Frau Dr. Laufenberg.

C. 3.13 Polyklonaler ANMT-Antikörper

C. 3.13.1 Anti-ANMT-Serum

Die Herstellung des polyklonalen Kaninchen-Antiserums gegen die rekombinante RgANMT erfolgte durch die Firma Nano-Tools (Teningen) unter Verwendung von ca. 0,7 mg des unter C. 3.7 gereinigten Proteins.

C. 3.13.2 Aufreinigung polyklonaler Antikörper

Das ANMT-Antiserum wurde zusätzlich durch Blot-Affinitätsreinigung nach Smith und Fisher (1984), mit leichten Veränderung nach T. Vogt (IPB, Halle (persönliche Mitteilung J. Hans)), gereinigt.

Rekombinante ANMT mit „His-Tag“ wurde über IMAC gereinigt und ein Aliquot (200 µg) durch SDS-PAGE bei 100 V aufgetrennt. Das Protein wurde hier in einer Tasche über fast die gesamte Gelbreite appliziert und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet (C. 3.13.3). Ein Randstreifen der Membran, der die Markerspür und ein wenig aufgetrennter Proteinprobe aufwies, wurde abgetrennt und mit einer 0,025 % (w/v) CBB R250-Lösung (Coomassie Brilliantblau R-250 in 40 % MeOH) behandelt, um die Bande des rekombinanten Proteins zu lokalisieren. Die korrekte Bande wurde ausgeschnitten und die Membran mit 5 % (w/v) Milchpulver in TBS pH 7,5 für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Der so vorbehandelte Membranstreifen wurde mit 6-10 ml Antiserum in einem 15 ml fassenden Falconröhrchen über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert, um eine gute Bindung der Antikörper an das geblottete Enzym zu ermöglichen. Anschließend wurde der Streifen 4 mal mit TBS (pH 7,5) gewaschen. Zur Elution der Antikörper erfolgte die Inkubation des Membranstreifens zweimalig in 1 ml 0,1 M Glycin pH 2,5 bei Raumtemperatur für 5 min unter Schütteln. Danach wurde jeweils die Lösung abgenommen und durch Zugabe von 300 µl 1 M Tris-HCl pH 8,5 sofort wieder neutralisiert. Zur anschließenden Konzentrierung der Antikörper dienten Centricon YM-10 Filtereinheiten.

C. 3.13.3 Induktion der RgANMT in Zellkulturen

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe des Elizitors wurden *Ruta*-Zellen extrahiert und die Proteinmengen der Extrakte bestimmt. Äquivalente Aliquots wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (C. 3.3.2) und auf PVDF-Membran (9 x 6cm) geblottet (Semi-Dry-Blot, Schleicher & Schuell, Dassel). Dazu wurde die Membran zuvor für 15 min in 100 % Methanol aktiviert, dann mit H₂O dest. gewaschen und schließlich in Anodenpuffer II für 5 min voräquiliibriert. 6 Blätter Whatman 3MM Filterpapier (9 x 6 cm) wurden mit den entsprechenden Puffern (B. 9.11) befeuchtet und als Unterlagen verwendet.

Der Proteintransfer erfolgte bei 100 V für 30 min. Danach wurde die Membran sofort in TBS pH 7,5 überführt und für einige Minuten äquiliibriert. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, erfolgte anschließend eine Inkubation der Membran in TBS pH 7,5 mit 5 % (w/v) Milchpulver als Blockierungsreagenz für 1 h bei Raumtemperatur. Die Bindung des Primär-ANMT-Antikörper (Verdünnung 1:2000) fand ebenfalls in TBS pH 7,5 mit 5 % (w/v) Milchpulver über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schütteln statt.

Durch dreimaliges Waschen der Membran in TTBS wurde unspezifisch gebundener Primärantikörper entfernt. Darauf folgte eine Äquiliibration in TBS pH 7,5 für 3 mal 5 min.

Der Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, Sigma A-7539) wurde in einer Verdünnung von 1:4000 in TBS pH 7,5 mit 5 % (w/v) Milchpulver für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Entfernung von unspezifisch gebundenem Sekundärantikörper fand eine dreimalige Inkubation der Membran für 5 min in TTBS und anschließend eine Äquiliibration in Alkalische-Phosphatase-Substratpuffer (TBS pH 9,5 mit 50 mM MgCl₂) statt.

Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) [Stammlösung 50 mg/ml gelöst in 100 % DMF] und 300 µl p-Nitroblau-tetrazoliumchlorid (NBT) [Stammlösung 75 mg/mg gelöst in 70 % DMF] in 15 ml Alkalische-Phosphatase-Substratpuffer gestartet. Nach einer ausreichenden Reaktionsdauer wurde die Farbreaktion durch Waschen der Membran in H₂O dest. beendet.

C. 4 Datenanalyse und phylogenetische Untersuchungen

Das apparente Molekulargewicht rekombinanter Proteine wurde mit dem Programm PeptidMass (<http://www.expasy.org/tools/petide-mass.html>) berechnet. Die Aminosäuresequenz wurde auf evtl. vorhandene plastidäre Sequenzbereiche mit dem Programm SignalP (Emanuelsson *et al.*, 2007; www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) untersucht. Sequenzvergleiche mit Gen-Datenbanken wurden mit den Programmen Blast X (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) oder WU-Blast2 (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/>) durchgeführt. Für Alignments von Nukleinsäuren- und Proteinsequenzen dienten die Programme ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) und BioEdit (Hall (1999) Version 7.0.5.3; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEDIT/bioedit.html>).

Die phylogenetische Analyse wurde mit dem Programm DAMBE (Xia und Xie, 2001) unter Verwendung von 'maximal Parsimony' als Berechnungsalgorithmus ausgeführt. Um eine statistisch unabhängige Berechnung zu garantieren, wurde ein Bootstrap mit 1000 Wiederholungen und eine randomisierte Sequenzeingabe verwendet.

D. Ergebnisse

D. 1 Reinigung der ANMT aus *Ruta graveolens* L. Zellkulturen

Ein erster Versuch der ANMT-Reinigung aus *Ruta graveolens* Zellkulturen wurde bereits von Maier *et al.* (1995) unternommen, der jedoch erfolglos verlief. Die Gründe dafür sind nicht vollständig klar und aus dem damals bestimmten Molekulargewicht konnten keine eindeutigen Ergebnisse gezogen werden. Alternativ bot sich ein Versuch der ANMT-Klonierung aufgrund der Annahme einer ausgeprägten Ähnlichkeit zu bekannten OMT-Sequenzen an. Ein entsprechender Versuch unter Verwendung degenerierter Primer blieb aber erfolglos (Burga, 2005). Daher wurde ein erneuter Reinigungsversuch aus *Ruta*-Zellen unternommen, wobei die Induktion durch Hefeextrakt (Junghanns *et al.*, 1995) die Aussichten auf einen Erfolg begünstigen sollten.

D. 1.1 Rohextraktgewinnung und fraktionierende Ammoniumsulfatfällung

Das Ausgangsmaterial bildeten 10 Tage alte *Ruta graveolens* R-20 Zellkulturen, die für 16 ½ h mit Hefeextrakt induziert worden waren. Zur Schonung des Enzyms während der Aufarbeitung waren dem Extraktionspuffer Glycerin sowie DTT zugesetzt. Außerdem erfolgte die gesamte Aufarbeitung bei 4 °C. Die sorgfältig von Medium befreiten Zellen (etwa 675 g Feuchtgewicht) wurden in 1687 ml Puffer aufgearbeitet und das Protein (3375 mg) durch Ammoniumsulfatfällung fraktioniert. Der größte Teil der ANMT präzipitierte bei einer Sättigung von 30-50 % Ammoniumsulfat (810 mg Protein). Bereits während der Aufarbeitung zeigte die RgANMT eine gute Stabilität.

D. 1.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

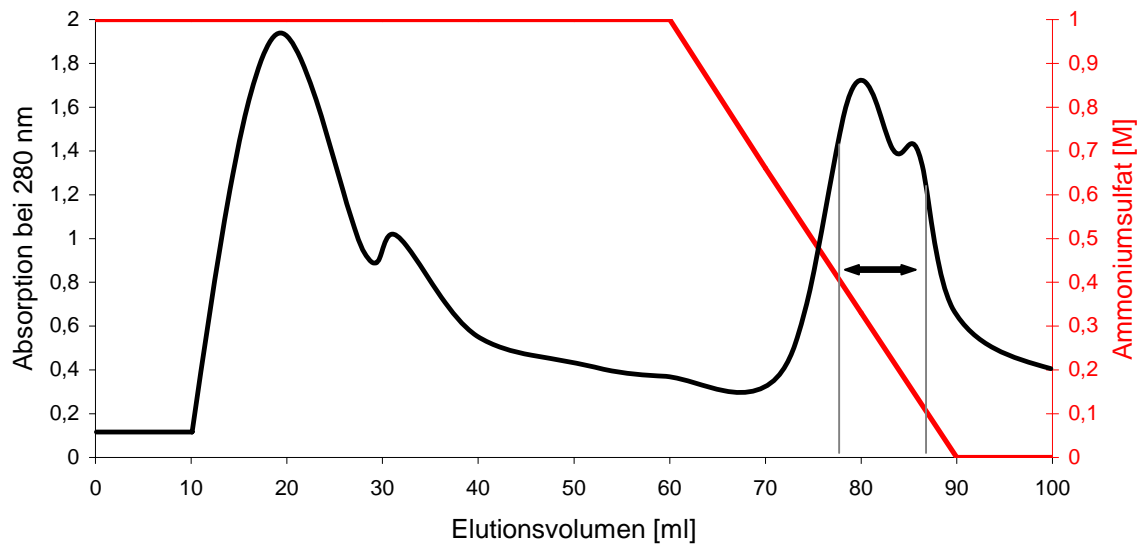


Abb. 9: Elutionsprofil einer HIC

Für die HIC wurde eine Fractogel EMD Propyl 650 (S) Säule (Merck, Darmstadt) verwendet, auf die in mehreren Läufen 3375 mg Gesamtprotein mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgebracht wurde. Die Detektion eluierter Proteine erfolgte bei 280 nm. Elutionsbereiche mit aktiven Fraktionen sind durch einen schwarzen Doppelpfeil und graue Begrenzungsstriche gekennzeichnet.

Das Prinzip der hydrophoben Interaktionschromatographie beruht auf den Wechselwirkungen hydrophober Bereiche in Proteinen mit der Oberfläche der verwendeten Matrix. In rein wässriger Umgebung faltet sich das Protein so, dass überwiegend nur hydrophile Gruppen an der Oberfläche mit dem Lösungsmittel in Wechselwirkung treten. Diese „geordnete Struktur“ lässt sich durch chaotrope Salze wie z.B. Ammoniumsulfat brechen und das Wasser aus der Oberflächen-Hydratation verdrängen, wobei vermehrt hydrophobe Bereiche des Proteins exponiert werden und mit dem Säulenmaterial interagieren können. Eine lineare Abnahme des Ammoniumsulfates im Puffer führt dann graduell zur Elution der Proteine von der Säule. Die Stärke der Bindung des Proteins bzw. die Bedingungen der Elution sind abhängig von der Natur der hydrophoben Oberfläche des Säulenmaterials. Bei der HIC-Reinigung treten unterschiedlich große Verluste an Enzymaktivität auf, was vermutlich auf einer irreversiblen Denaturierung bei dieser Form der Chromatographie beruht. Die Kombination der fraktionierenden Ammoniumsulfatfällung mit der HIC ist besonders günstig, weil eine Entsalzung entfällt.

Für die Reinigung der ANMT wurde eine Fractogel EMD 650 (S) Säule der Firma Merck verwendet, die Propylgruppen trägt.

Die Enzymfraktionen der Ammoniumsulfatfällung (D. 1.2) wurden in 67,5 ml Äquilierungspuffer (B. 9.7) aufgenommen und portionsweise ca. 8 ml durch HIC gereinigt. Nach Aufbringen der Probe wurde die Säule mit mehreren Säulenvolumen des Puffers B. 9.7 gewaschen, bevor die Elution mit einem absteigenden Ammoniumsulfatgradienten durchgeführt wurde (Abb. 9). Die ANMT-Aktivität eluierte ab etwa 0,6 M Ammoniumsulfat bis etwa 0,1 M. Die gesammelten Fraktionen (164 mg Protein in 82 ml) wurden für die Gelpermeationschromatographie verwendet.

D. 1.3 Gelpermeationschromatographie (GPC)

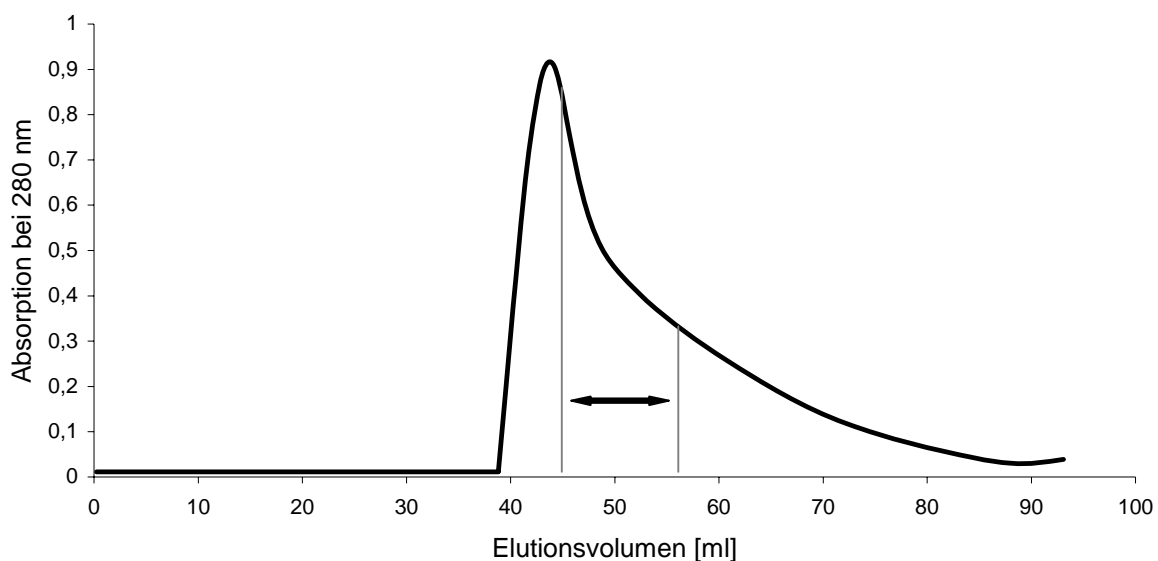


Abb. 10: Elutionsprofil einer GPC

Für die GPC wurde eine Fractogel EMD BioSEC Säule (Merck, Darmstadt) verwendet, auf die in mehreren Läufen 810 mg Gesamtprotein mit einer Flussrate von 1mg/ml aufgebracht wurde. Die Detektion eluierter Proteine erfolgte bei 280 nm. Elutionsbereiche mit aktiven Fraktionen sind durch einen schwarzen Doppelpfeil und graue Begrenzungsstriche gekennzeichnet.

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) oder Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC) bzw. Gelfiltration macht sich zu Nutze, dass die stationäre Phase von Poren einer definierter Größe durchzogen wird. Große Proteine können weniger in die Matrix eindringen und haben so ein kleineres Verteilungsvolumen zur Verfügung. Kleinen Proteinen steht ein größeres Volumen zur Verfügung und sie eluieren dementsprechend später.

Die GPC kann auch zur Bestimmung des Molekulargewichtes (M_r) eines Enzyms im Vergleich zu Referenzproteinen mit bekanntem Molekulargewicht eingesetzt werden. Einigermmaßen zuverlässige Werte lassen sich dabei aber nur für globuläre Proteine erwarten.

Die nach der HIC gesammelten ANMT-Fractionen (164 mg Protein) wurde durch 80-%ige Ammoniumsulfatfällung und Aufnahme in 6 ml Puffer (B. 9.7) konzentriert und portionsweise (je 1 ml) über die GPC-Säule gereinigt (Abb. 10).

D. 1.4 Anionenaustauscherchromatographie

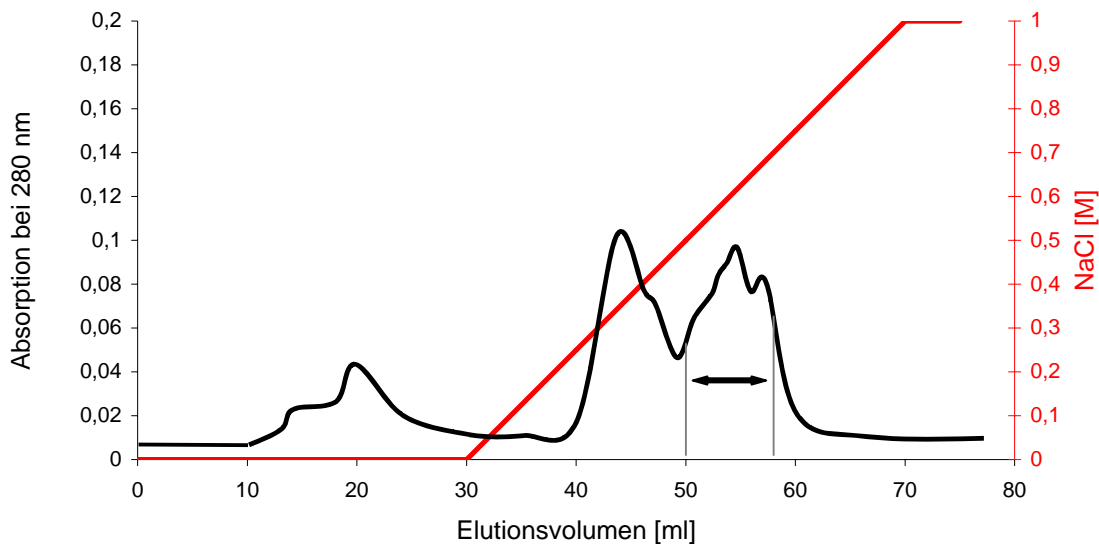


Abb. 11: Elutionsprofil eines Anionenaustauscherchromatographielaufes

Für die Anionenaustauscherchromatographie wurde eine Fractogel DEAE 650 (S) Säule (Merck, Darmstadt) verwendet, auf die 164 mg Gesamtprotein in mehreren Läufen mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgebracht wurde. Die Elution von Proteinen wurde bei 280 nm verfolgt. Elutionsbereiche mit aktiven Fraktionen sind durch einen schwarzen Doppelpfeil und graue Begrenzungsstriche gekennzeichnet.

Die meisten pflanzlichen Proteine besitzen einen isoelektrischen Punkt im Bereich von pH 4-5 und liegen in schwach basischen Puffern als Anionen vor, die sich an Anionenaustauschern durch Salzgradienten trennen lassen. Die weitere Reinigung der ANMT erfolgte an einem schwachen Anionenaustauscher mit funktionellen Diethylaminoethylrest (DEAE)-Gruppen.

Die aktiven Fraktionen von vier GPC-Läufen wurden vereinigt (32 ml mit einer Proteinmenge von 32 mg) und für den nächsten Schritt verwendet. Da durch die GPC störende Substanzen wie Salze aufgrund ihrer kleineren Größe leicht von Proteinen abgetrennt werden können, war es möglich, die aufgefangenen Fraktionen direkt für eine anschließende Anionenaustauscherchromatographie zu verwenden.

Die ANMT eluierte über einen Bereich von 0,5 bis 0,7 M NaCl und wurde in fünf Fraktionen aufgefangen (Abb. 11). Aus vier Trennungen wurden 1,3 mg Protein in 13 ml gesammelt.

D. 1.5 Affinitätschromatographie an Adenosin-Agarose

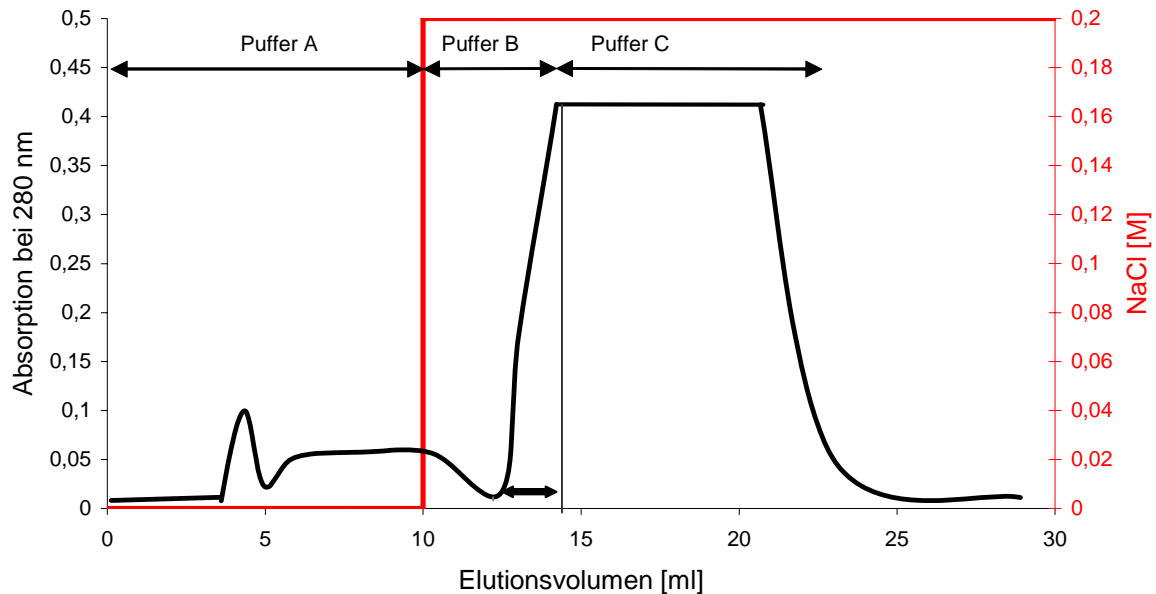


Abb. 12: Elutionsprofil einer Affinitätschromatographie an Adenosin-Agarose

Für die Affinitätschromatographie diente Adenosin 5'-Monophosphat Agarose (A-1271; Sigma-Aldrich (Taufkirchen)), die zuvor nach einer Methode von James *et al.* (1995) dephosphoryliert wurde. 1,3 mg Gesamtprotein wurde mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Säule aufgebracht. Die spezifische Elution von Proteinen erfolgte mit 2 mM SAM in Puffer C. Die Detektion eluierter Proteine fand bei 280 nm statt. Elutionsbereiche mit aktiven Fraktionen sind durch einen schwarzen Doppelpfeil und graue Begrenzungsstriche gekennzeichnet.

Adenosin-Agarose ist bereits zur Affinitätschromatographie anderer Methyltransferasen eingesetzt worden (James *et al.*, 1995; Kato *et al.* 1999). Es ist wahrscheinlich, dass die Bindung dieser Enzyme über ihre SAM-Bindestelle erfolgt. Im Handel war allerdings nur Adenosin 5'-Monophosphat-Agarose erhältlich, die vor Gebrauch dephosphoryliert werden musste. Die spezifische Elution gebundener Enzyme erfolgt dann mit SAM, das eine höhere Affinität zeigen sollte.

Das vom Ionenaustauscher eluierte Enzym wurde über eine PD-10 Säule umgepuffert und auf die Adenosin-Agarose-Säule gegeben. Nach dem Spülen mit Puffer A und B konnten an der Säule gebundene Proteine spezifisch durch den Zusatz von 2 mM SAM in Puffer C eluiert werden. Der starke Anstieg der Absorption bei Wechsel von Puffer B zu C (Abb. 13) ist auf die Absorption von SAM bei 280 nm zurückzuführen.

Die ANMT-Aktivität konnte kurz nach dem Wechsel auf Puffer C im Eluat detektiert werden. Diese war im Vergleich zur Aktivität im Säulenauftrag apparent gering. Bereits nach einmaligem Einfrieren der eluierten Proben konnte keinerlei Enzymaktivität mehr festgestellt werden.

Die SDS-PAGE mit Silberfärbung zeigte nach Affinitätschromatographie nur noch für diese Probe eine Hauptbande von 40 kDa (Abb. 13) und zwei schwache Nebenbanden. Auf einen weiteren Reinigungsschritt konnte daher verzichtet werden.

Die gesamte Reinigung ist in Tab. 5 zusammengefasst.

Die Ammoniumsulfatfällung führte zu einem starken Verlust der Aktivität, was die spezifische Aktivität erniedrigte bei gleichzeitig geringerer Proteinausbeute. Auf diese Fraktionierung konnte jedoch nicht verzichtet werden. Die spezifische Aktivität stieg aber in den nachfolgenden Schritten an, wobei die beiden letzten Reinigungsschritte besonders effektiv waren. Vor allem die Affinitätschromatographie war essentiell für die Anreicherung der ANMT und führt zu sehr wenig Protein mit einer spezifischen Aktivität von 712,8 pkat/mg. Der Reinigungsfaktor von 45,2 erscheint sehr niedrig im Vergleich zur Reinigung anderer Enzyme in der Literatur, aber die spezifische Aktivität der weitgehend sauberen ANMT ist ebenfalls vergleichsweise niedrig, sodass insgesamt ein hoher Verlust an Aktivität während der Reinigung eintritt. Dies war unerwartet, da die Aktivität im Rohextrakt relativ stabil erschien.

Tab. 5: Reinigungstabelle für die ANMT aus *R. graveolens* Zellkulturen

Reinigungsschritt	Protein [mg]	spezifische Aktivität [pkat/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	3375	15,8	100	1
Ammoniumsulfatfällung von 30 bis 50 %	810	5,8	8,8	0,4
Fractogel EMD Propyl 650 (S)	164	20,3	6,3	1,3
Fractogel EMD BioSEC	32	45,4	2,7	2,9
Fractogel DEAE 650 (S)	1,3	297,7	0,7	18,9
Adenosin-Agarose	0,03	712,8	0,04	45,2

D. 1.6 SDS-PAGE für die Mikrosequenzierung

Das von der Affinitätschromatographie eluierte Enzym wurde in Centricon Filtereinheiten (Millipore, USA) konzentriert und für eine SDS-PAGE eingesetzt, die unter den Bedingungen, die für eine anschließende Mikrosequenzierung (Functional Genomics Center, Universität Zürich) nötig waren, durchgeführt wurde. Insbesondere musste die Färbung für diesen Zweck mit spezieller Coomassie-Lösung (B. 9.2) anstelle der Silberfärbung (Abb. 13) erfolgen. Nach dem Entfärben des Gels wurden zwei gut sichtbare Proteinbanden (Pfeile in Abb. 13) ausgeschnitten und sequenziert. Dabei handelte es sich um eine Hauptbande von 40 kDa und eine schwächere Bande von etwa 60 kDa. Nur nach Silberfärbung war noch eine extrem schwache Bande unterhalb von 40 kDa zu erkennen, die aber nicht sequenziert wurde.

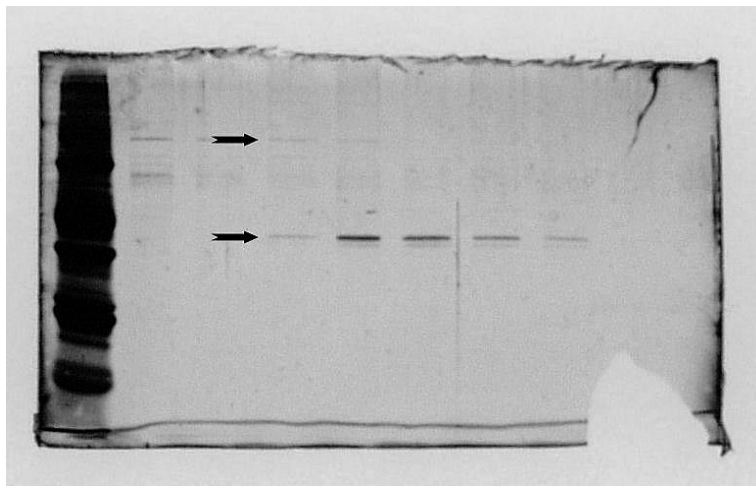


Abb. 13: SDS-PAGE einer Affinitätschromatographie

Die abgebildete SDS-PAGE zeigt ein Beispiel für die verwendeten Proteinbanden der Mikrosequenzierung. Das Gel wurde zur Detektion von Proteinen mit Silber gefärbt. Am linken Rand ist ein Größenmarker zu sehen. Die anderen Spuren zeigen verschiedene Elutionsfraktionen einer Affinitätschromatographie, dabei wurden jeweils 20 µl der Elutionsfraktionen aufgetragen. Die Pfeile markieren die Banden auf Höhe von 40 kDa und 60 kDa, die für die Sequenzierung verwendet wurden.

D. 1.7 Partielle Mikrosequenzierung

Die partielle MALDI-TOF Mikrosequenzierung der aus dem Gel eluierten Banden erforderte einen Verdau, der mit Trypsin durchgeführt wurde (Dr. Hunziker, Functional Genomics Center, Universität Zürich). Da das Molekulargewicht der ANMT noch unklar war, wurden zunächst auch Fragmente der 60 kDa Bande ansequenziert. Datenbankvergleiche zeigten jedoch bald, dass es sich um ein Keratin-ähnliches Peptid handelte, das nicht weiter von Interesse war.

Sequenzierte Peptide aus der 40 kDa Bande zeigten bereits in ersten Vergleichen Ähnlichkeiten zu Methyltransferasen. Die Sequenzen und Anmerkungen von den 16 sequenzierten Peptidfragmenten der 40 kDa Bande sind in Tab. 6 zusammengestellt.

Tab. 6: Partialsequenzen des 40 kDa Polypeptids

Peptidnummer	Sequenz	m/z	Anmerkungen*
1	APVMLDR	800,41	eindeutige Sequenz
2	FSDTYHR	924,41	Sequenz HR ist wahrscheinlich
3	LYGLTSVSK	966,52	eindeutige Sequenz
4	QSVSGPTVGR	989,41	Sequenz PTVG ist wahrscheinlich
5	TLLQAAGNPK	1011,59	LT kann auch TL, AG kann auch GA oder Q oder K sein
6	LLASYDLLK	1034,59	SYDLL ist wahrscheinlich
7	LFEYASSSNK	1144,54	SSN ist wahrscheinlich
8	SLSESHTQYK	1178,52	SL kann auch LS sein
9	VFFESWFGVK	1244,58	W kann auch VS oder SV sein
10	EVMEGGL	1247,62	eindeutige Sequenz
11	QVFEGGLPFNR	1262,77	PFN ist wahrscheinlich
12	VSLSESHTQYK	1277,28	VS kann SV oder W sein; SH ist wahrscheinlich
13	QVYEGGLPFNR	1278,55	PFN ist wahrscheinlich
14	VLDCSVSGAPVD	1359,61	C passt nur wenn durch Acrylamid modifiziert; PVD ist wahrscheinlich
15	SVVPETPEVSSSAR	1443,69	VS kann SV oder W sein; EVSSSA ist wahrscheinlich; SSA kann auch ASS oder SAS sein

*(Angaben von Herrn Dr. Peter Hunziker, Functional Genomics Center, Universität Zürich)

Von diesen 15 Peptidfragmenten zeigten die Peptide 1, 2, 3, 5, 6, 11, 12, und 13 Ähnlichkeiten zu pflanzlichen *O*-Methyltransferasen, vor allem zu Kaffeat *O*-Methyltransferasen. Peptid 4 besaß Ähnlichkeit zu einer putativen *O*-Methyltransferase aus *Streptomyces coelicolor* (NP 630995). Auffällig waren die Peptidsequenzen 8 und 12 sowie die Sequenzen 10, 11 und 13, da sie große Übereinstimmungen untereinander aufweisen.

D. 2 Molekularbiologie der ANMT

D. 2.1 Spezifische degenerierte Primer

Basierend auf den in Tab. 6 dargestellten Peptidsequenzen konnten nun degenerierte Primer für die Klonierung einer möglichen ANMT erstellt werden.

Sequenzvergleiche zeigten, dass Motive mit Ähnlichkeit zu Peptid 1 und Peptid 11 (Tab. 6) in vielen MTn vorhanden sind, meist in einem Abstand von ungefähr 83 Aminosäuren (entspricht 249 bp) zueinander angeordnet. Peptid 1 ist außerdem immer stromaufwärts zum N-Terminus lokalisiert. Deshalb wurde aus Peptid 1 ein Forwardprimer (Metdg_gbh1; Tab. 3)

entwickelt. Im Gegenzug dazu diente Peptid 11 (Metdg_gb2; Tab. 3) als Reverseprimer. Es wurden jeweils degenerierte Primer synthetisiert, um alle möglichen Codon-Kombinationen abzudecken.

D. 2.2 Amplifizierung eines ersten ANMT-spezifischen Fragmentes

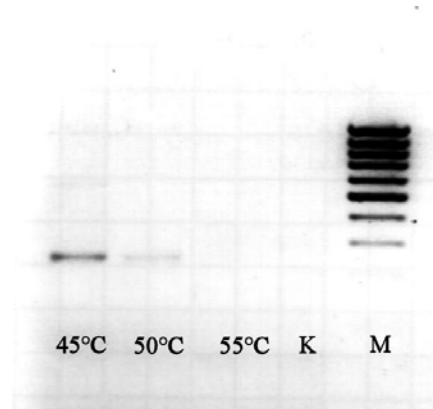


Abb. 14: Amplifizierung eines ersten ANMT-spezifischen Fragmentes

Amplifizierung eines ca. 250 bp langen Teilsequenzstückes mit degenerierten Primern (Metdg_gb1h und Metdg_gb2) bei Annealingtemperaturen von 45, 50 und 55 °C. Es wurde 1 µl Gesamt-DNA als Template eingesetzt. Als Kontrolle (K) wurde ein PCR-Ansatz ohne Template bei 50 °C durchgeführt. Als Marker (M) diente der 100 bp von MBI Fermentas. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mit 1,5-%igem Agarosegel. Für die PCR wurden folgende Bedingungen verwendet: primäre Denaturierung für 5 min bei 95 °C; 39 Zyklen: Denaturierung bei 95 °C für 5 min, Annealing bei 45, 50 und 55 °C für 2 min, Elongation bei 72 °C für 2 min; finale Elongation bei 72 °C für 5 min.

Als Template für die cDNA-Amplifizierung diente Gesamt-RNA aus *Ruta*-Zellen, die 3 h mit *Pmg* als Elizitor induziert waren. Die RNA wurde nach Giuliano *et al.* (1993) extrahiert, die mRNA mit reverser Transkriptase umgeschrieben und die cDNA zur Amplifizierung mit den Primern (Metdg_gb1h und Metdg_gb2; Tab. 3) verwendet. Die besten Ergebnisse für eine Bindung der degenerierten Primer lagen bei einer Temperatur von 45 °C und 50 °C. Bei 55 °C war keine PCR-Produktbildung erkennbar. Für die Klonierung wurde das bei einer Temperatur von 45 °C gebildete PCR-Produkt verwendet.

Durch Klonierung und anschließende Sequenzierung war ein Vergleich mit der NCBI-Datenbank möglich, der ein 239 bp langes Sequenzpeptid einschließlich der flankierenden Primersequenzbereiche ergab (Abb. 14). Die amplifizierte Teilsequenz wies mit 58 % die höchste Ähnlichkeit zur Eugenol-OMT aus *Rosa chinensis* var. *spontanea* (AB086103; Wu *et al.*, 2003) auf.

D. 2.3 Verlängerung zur vollständigen cDNA

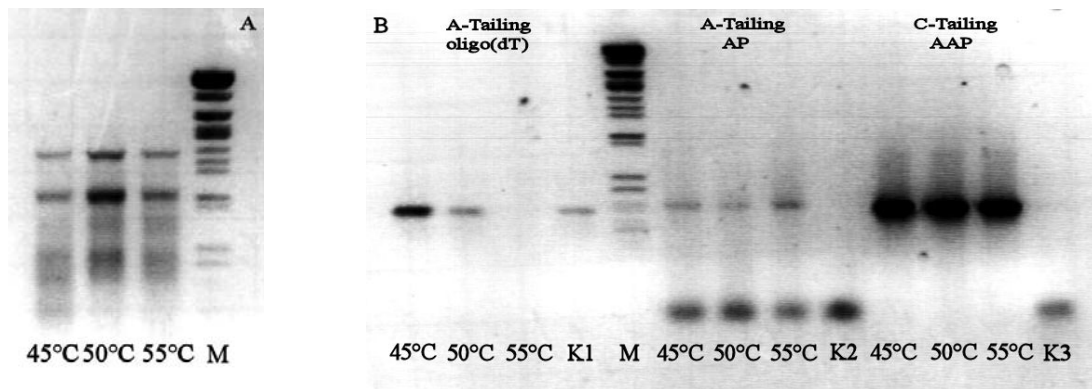


Abb. 15: 3'-und 5'-RACE der RgANMT

Die PCR fand unter folgenden Bedingungen statt: primäre Denaturierung bei 95 °C für 5 min; 39 Zyklen: Denaturierung bei 95 °C für 1 min, Annealing bei 45, 50 oder 55 °C für 1 min; Elongation bei 72 °C für 2 min; finale Elongation bei 72 °C für 5 min. Jeder PCR-Ansatz enthielt 1 µl Gesamt-DNA als Template. Als Kontrollen (K1-K3) diente jeweils ein PCR-Ansatz ohne Template. Als Marker (M) wurde der λ-Marker von MBI Fermentas (St. Leon Roth) verwendet. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte auf einem 1,5-%igem Agarosegel.

Teil A: Amplifizierung des 3'-Endes der RgANMT unter Verwendung der Primer Metdg_gb1h und AP. Es wurde ein PCR-Endprodukt von etwa 1100 bp erwartet.

Teil B: Amplifizierung des 5'-Endes der RgANMT unter Verwendung von A- und C-tailing als Template mit den Primern oligo-(dT) und AP für das A-tailing und dem Primer AAP für das C-tailing. Es wurde ein PCR-Produkt von etwa 350 bp erwartet.

Die Verlängerung einer cDNA-Teilsequenz in 3'-Richtung nutzt den poly(A)-Bereich der Transkripte. Bei der reversen Transkription der mRNA in cDNA wurde ein spezifischer Anchor Primer (AP) verwendet, der diesem poly(A)-Bereich stromabwärts eine zusätzliche Sequenz anfügt. Für die Amplifizierung des 3'-Bereiches wurde dann dieser AP als Matrize für den reversen Primer verwendet. Als Forwardprimer konnte der bereits zuvor (C. 2.6.2) verwendete Primer Metdg_gb1h (Tab. 3) genutzt werden. Es wurde so ein 957 bp langes Fragment einschließlich eines nicht kodierenden Bereiches von 90 bp amplifiziert (Abb. 15; Teil A). Auch dieses Fragment bestätigte weiterhin eine hohe Identität mit OMTn.

Für das 5'-RACE war zunächst die unter Punkt C. 2.6.3.2 beschriebene Bearbeitung der cDNA notwendig. Dabei wurde versucht, durch die Verwendung eines teilsequenzspezifischen Primers [MetR5'_2GNFMALP] als 3'-Endprimer, aus der gesamten mRNA nur ANMT-spezifische cDNA zu erhalten. Im nächsten Schritt wurde dem 5'-Ende mittels Terminaler Transferase ein Poly-Cytidin- oder Poly-Adenin-Bereich („C-tailing“ oder „A-tailing“) vorgelagert und die so behandelte cDNA für die PCR eingesetzt.

Die besten Ergebnisse in der weiterführenden PCR konnten mit der cDNA des „C-tailings“ erzielt werden, da so die größte Menge an PCR-Produkt gebildet wurde (Abb. 15; Teil B). Außerdem konnte keinerlei Produktmengenunterschied zwischen den verschiedenen

Annealingtemperaturen (45 °C, 50 °C oder 55 °C) festgestellt werden. Es entstand jeweils ein Produkt auf Höhe von ca. 350 bp wie erwartet. Daher diente das PCR-Produkt des „C-tailings“ (45 °C) für die Klonierung des 5'-Endes. Die Sequenzierung ergab ein Fragment von 371 bp einschließlich des 70 bp langen flankierenden untranslatierten 5'-Bereiches (UTR). Die Ergebnisse der PCR-Amplifizierung definierten die Enden der Transkripte. Daraufhin konnten End-to-End-Primer für eine vollständige Amplifizierung der cDNA abgeleitet werden, die dann in einer Proofreading-PCR eingesetzt wurden (Abb. 16). Bei allen Temperaturen für die Hybridisierung (Annealing) zeigte sich ein Amplicon von 1100 bp. Das PCR-Produkte bei 50 °C wurde für die anschließende Weiterbearbeitung verwendet.



Abb. 16: Proofreading-PCR der RgANMT mit genspezifischen End-to-End-Primern

Die PCR fand unter folgenden Bedingungen statt: primäre Denaturierung bei 95 °C für 5 min; 39 Zyklen: Denaturierung bei 95 °C für 1 min, Annealing bei 45, 50 oder 55 °C für 1 min; Elongation bei 72 °C für 2 min; finale Elongation bei 72 °C für 5 min. Zur Amplifizierung der vollständigen cDNA wurden die Primer MetFor15b und MetRev15b (Tab. 3) eingesetzt. Als Template diente 1 µl Gesamt-DNA. Als Kontrolle (K) wurde jeweils ein PCR-Ansatz ohne Template inkubiert. Als Marker (M) wurde der λ-Marker von MBI Fermentas (St. Leon Roth) verwendet. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte auf 1,5-%igen Agarosegelen und Betrachtung unter UV satt. Es wurde ein PCR-Produkt mit einer Länge von etwa 1100 bp erwartet.

D. 3 Sequenzanalyse

Die RgANMT-Sequenz umfasst einen offenen Leserahmen („open reading frame“, ORF) von 1095 bp, der für ein Protein von 365 Aminosäuren kodiert (Abb. 17). Flankiert wird der Leserahmen durch eine 70 bp 5'-UTR und eine 90 bp 3'-UTR, worauf ein 25 bp langer poly(A)-Schwanz folgt.

Die durchschnittliche Molekularmasse des translatierten Proteins wurde mit dem Programm PeptidMass zu 40059 Da und der isoelektrische Punkt (pI) mit 5,72 berechnet. Untersuchungen mit dem Programm SignalP wiesen auf keinerlei plastidäre Erkennungssequenzbereiche hin. Von den durch partielle Mikrosequenzierung zuvor ermittelten 15 Sequenzen (Tab. 6) konnten 14 mit kleinen Änderungen in der RgANMT-Sequenz wiedergefunden werden, wohingegen die Peptidsequenzen Nr. 4 und Nr. 6 (Tab. 6) nicht zugeordnet werden konnten. Die Sequenz der *RgANMT* ist in der NCBI-Datenbank unter der Accession-Nummer DQ884932 veröffentlicht.


```

1   ATCAGTCGTTCACTAAACGAAGACTAAATCTTGAGAATAGGGGGAGGGGGGTATCCAATTTCCAATTTCAATGGGTTCTTTATCGGAATC
                                     M G S L S E S

91  CCACACGCAGTACAAACATGGGGTGAAGTAGAAGAAGATGAAGAAGAAAGCTATTACGTGCCATGCAGCTCTCGATGGCCATAGTGCT
   H T Q Y K H G V E V E E D E E E S Y S R A M Q L S M A I V L

181 GCCCATGGCAACCAATCGGCCATTAGCTCGGCGTTTTTGAGATCATAGCCAAAGCCCGAGCGGGAGACTCTCTGCTTCGGAGATCGC
   P M A T Q S A I Q L G V F E I I A K A P G G R L S A S E I A

271 GACAATTTTACAGGCACAAAACCCCAAAGCACCGGTGATGCTGGATCGAATGCTCAGGCTACTGGTCAGCCACCGCGTGTGATTGCTC
   T I L Q A Q N P K A P V M L D R M L R L L V S H R V L D C S

361 CGTTTCTGGTCTGCGGCGAGAGGCTATACGGTCTCACTTCCGTGTCCAAATACCTTTGTCCCGATCAGGATGGTGCTTCACTGGGTAA
   V S G P A G E R L Y G L T S V S K Y F V P D Q D G A S L G N

451 CTTTCATGGCGTTGCCCTCGACAAGGTCTTCATGGAGAGCTGGATGGGTGTGAAGGGAGCAGTGATGGAGGGAGGGATACCATTCACAG
   F M A L P L D K V F M E S W M G V K G A V M E G G I P F N R

541 GGTGCATGGAATGCACATATTTGAGTACGCATCAAGCAACAGCAAGTTGAGCGACACCTACCACAGGGCCATGTTTAACTCACTCAACCAT
   V H G M H I F E Y A S S N S K F S D T Y H R A M F N H S T I

631 AGCTCTGAAGAGAATCCTTGAACATTACAAGGGCTTTGAGAATGTCACCAAGCTTGTGACGTCGGCGGAGGCCTCGGTGTCACTCTCAG
   A L K R I L E H Y K G F E N V T K L V D V G G G L G V T L S

721 TATGATCGCTTCCAAATATCCCCACATTCAGGCGATTAACTTTGACTTGCTCATGTTGTTCAAGATGCCGCTTCCTACCCTGGCGTGGA
   M I A S K Y P H I Q A I N F D L P H V V Q D A A S Y P G V E

811 GCATGTGGGAGGAAACATGTTGAAAGTGTTCAGAGGGAGATGCCATTCTCATGAAGTGGATACTCCATTGCTGGGACGACGAACAGTG
   H V G G N M F E S V P E G D A I L M K W I L H C W D D E Q C

901 CTTGAGGATATTGAAGAACTGTTACAAGGCCACTCCGGAAGCGGAAGGTGATAGTTATGAATTCAGTAGTACCGGAGACGCCGGAGGT
   L R I L K N C Y K A T P E N G K V I V M N S V V P E T P E V

991 GAGCTCCTCCGAAGAGAAACGTCGCTGCTGGATGTGCTTTTGATGACCCGAGATGGAGGTGGGAGGGAGAGAACCCAGAAAGAATTAC
   S S S A R E T S L L D V L L M T R D G G G R E R T Q K E F T

1081 TGAGTTGGCCATTGGAGCTGGGTTTAAGGGCATTAAATTTGCATGCTGCGTTTGTAACTCTCCACATCATGGAGTTCTTCAAGTAGATCTT
   E L A I G A G F K G I N F A C C V C N L H I M E F F K *

1171 CAATTTACAGGGACGCTGTAAAGTACCCGACTTCTCTCAGATTTTACCCCCAGTATGTACTGTCTCTTATGCTCTAATTATTAGCAAAAA
1261 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. 17: cDNA und translatierte Polypeptidsequenz der ANMT aus *Ruta graveolens*

Aus der partiellen Mikrosequenzierung bekannte Motive sind grau unterlegt. Start- und Stopcodons sind in Fettdruck hervorgehoben.

Die Sequenz der ANMT-cDNA wurde mit annotierten Sequenzen (NCBI) durch Blast X verglichen (Tab. 7). Dabei zeigte sich die höchste Identität zu einer OMT der Familie II aus *Medicago truncatula* (unveröffentlicht, AC150443) mit 56 % auf Aminosäureebene sowie zur Catechol-OMT III aus *Nicotiana tabacum* (Pellegrini *et al.*, 1993; X71430) mit ebenfalls 56 %. Weiterhin bestehen hohe Identitäten zu verschiedenen Kaffeat-OMTn aus *Nicotiana tabacum* (55 %, Toquin *et al.*, 2003; AF484252), *Medicago sativa* (53 %, Gowri *et al.*, 1991; M63853) oder *Clarkia breweri* (53 %, Wang und Pichersky, 1997; AF006009). Auch eine Kaffeat-OMT aus *Citrus sinensis x Citrus reticulata* (EF520737, unveröffentlicht), ebenfalls ein Vertreter der Familie der Rutaceae, besitzt 52 % Identität zur RgANMT. Außerdem konnte auch eine Ähnlichkeit zur Eugenol-OMT aus *Rosa chinensis* var. *spontanea* (54 %) festgestellt werden (Wu *et al.*, 2003; AB086103). Mit 54 % ist auch eine hohe Identität zu einer S-Methyltransferase aus *Catharanthus roseus* gegeben (Coiner *et al.*, 2006; DQ084384).

Der Sequenzvergleich zeigte jedoch keinerlei Ähnlichkeit der ANMT-Sequenz zu bekannten *N*-Methyltransferasen, wie z.B. aus der Koffeinbiosynthese, oder zu Carboxymethyltransferasen, die an der Biosynthese von Duftstoffen in Pflanzen beteiligt sind. Eine Zusammenfassung über die Sequenzidentitäten gibt die Tab. 7.

Tab. 7: Ähnlichkeit der ANMT zu Methyltransferasen

Die Angabe der Sequenzen erfolgt absteigend nach der höchsten relativen Identität zur RgANMT-Sequenz.

Quelle	Relative Identität (%)	NCBI-Accession
<i>Nicotiana tabacum</i> ; Catechol-OMT III	56	X71430 (Pellegrini <i>et al.</i> , 1993)
<i>Medicago truncatula</i> ; OMT (Familie 2)	56	AC150443 (unveröffentlicht)
<i>Nicotiana tabacum</i> ; Kaffeat-OMT II	55	AF484252 (Toquin <i>et al.</i> , 2003)
<i>Rosa chinensis</i> var. <i>spontanea</i> ; Eugenol-OMT	54	AB086103 (Wu <i>et al.</i> , 2003)
<i>Catharanthus roseus</i> ; S-Methyltransferase	54	DQ084384 (Coirer <i>et al.</i> , 2006)
<i>Populus kitakamiensis</i> ; Kaffeat-OMT1	53	D49710 (Hayakawa <i>et al.</i> , 1996)
<i>Populus tremuloides</i> ; Lignin bizpezifische Säure/5-Hydroxyferulasäure OMT	53	X62096 (Bugos <i>et al.</i> , 1991)
<i>Medicago sativa</i> L. Kaffeat-OMT	53	M63853 (Gowri <i>et al.</i> , 1991)
<i>Clarkia breweri</i> ; Kaffeat-OMT	53	AF006009 (Wang und Pichersky, 1997)
<i>Citrus sinensis</i> x <i>Citrus reticulata</i> Kaffeat-OMT	52	EF520737 (unveröffentlicht)

Ein Sequenzalignment (Abb. 18) der *RgANMT* mit verschiedenen Sequenzen des Datenbankvergleiches und zusätzlicher MTn zeigt vor allem Übereinstimmungen im C-terminalen Bereich. Im Gegensatz dazu sind kaum Sequenzähnlichkeiten zu anderen NMTn oder zu Carboxymethyltransferasen vorhanden. Die *RgANMT* enthält die typischen vorgeschlagenen SAM-Bindemotive A, B und C (Joshi und Chiang, 1998) sowie die Motive I-L aus der OMT II Familie von Ibrahim *et al.* (1998).

RgANMT	---MGLSESHQYKHGVEVEE---DBESYSRAMOLSMALVLPATQSAIOLGVFEITAKA--PGRLSASETATILQ-AQNEKAPVML
NtOMTIII	--MESSITK-----SQIPTQSEBERNCTYAMQLSSSVLPFVHSTIOLGVFEITAKSN-D-TKLSASQIVSOIPNCKNPDAATML
NtCOMTII	--MESSITK-----SQIPTQSEBERNCTYAMQLSSSVLPFVHSTIOLGVFEITAKSN-D-TKLSASQIVSOIPNCKNPDAATML
RcEOMT	---MASPLEIEIFGCPSIHVDAKRKEBESSFHAVQMLSSVLPMSQLATDLGLEVDVIKAG-TDAKLSALDTAAKIG-TKNPHAPVIL
MsCOMT	---MGSTG-----ETQITPTHISDEANLFAMOLASASVLPMTDKSAFELDLLEITAKAG-PGAQISPIETASOLP-TTNPDAPVML
CbIEMT	---MGSTGN-----AEIQIIPTHSSDEANLFAMOLASAAVLPMAKAAIELDLLEITAKSVPVPSGYISPAEIAAOLP-TTNPDAPVML
CrSMT	---MSHE-----EKPSNNKEDDDHSSYALQIVSEGLPMTVNAVITKLVFEITAKAG-PGAKLSPSQIVSQMP-TKNPDAPVIL
CsCNMT	MELATA-----GKVNELFMNRGEGESSYAONSSTQQVASMAQPALENAVETLFSRDF-HLQALNADLGCAGAPN-TFAVISTI
CbSMT	-----MDVRQVLHMKGGAGENSYAMNSFIQROVISITKPTTBAAITALYSQDGT-VTTRLAIALDLGCSSGPNALFAVTELI
NtPNMT	MEVISTNTNGSTIFKNGAIPMNGHQNGTSEHLNGYQNGTCKHQNGHQNGTBEHRNGHQNGTSEQONGTISHDNGNELLG-SSDSIKKGGWF

RgANMT	DRMLRLILVSHRVLDCSVSGPAG----ERTYGLTSVSKYVVPDQDGASLGNFMALPLDKVFMBSWMGVKCAVMEGGIPFNVRVHG-MHIFE
NtOMTIII	DRMLYVILASYSLETCISIVEDEENNGGQKRVYGLSQVCKEFVRDEDEGASMGPLLALLQDKVFINSWFELKDAVLEGGVPDRVHG-VHAFE
NtCOMTII	DRMLYVILASYSLETCISIVEDEENNGGQKRVYGLSQVCKEFVKNENGCASMGPLLALLQDKVFINSWFELKDAVLEGGVPDRVHG-VHAFE
RcEOMT	DRMLRLILVSHRVLDCSVSGPAG----ERTYGLTSVSKYVVPDQDGASLGNFMALPLDKVFMBSWMGVKCAVMEGGIPFNVRVHG-MHIFE
MsCOMT	DRMLRLILVSHRVLDCSVSGPAG----ERTYGLTSVSKYVVPDQDGASLGNFMALPLDKVFMBSWMGVKCAVMEGGIPFNVRVHG-MHIFE
CbIEMT	DRMLRLILVSHRVLDCSVSGPAG----ERTYGLTSVSKYVVPDQDGASLGNFMALPLDKVFMBSWMGVKCAVMEGGIPFNVRVHG-MHIFE
CrSMT	DRMLRLILVSHRVLDCSVSGPAG----ERTYGLTSVSKYVVPDQDGASLGNFMALPLDKVFMBSWMGVKCAVMEGGIPFNVRVHG-MHIFE
CsCNMT	KRMMEKKCRELNQTLQVYLNDLFGNDFNTLFGKLSSEVIGNKCEEVPCYVMGVPGSFHGRLLFPRNSLHLVHSSYSVHWLTQAPKGLT
CbSMT	KTVETTRKKMGRENSEPEYQIFLNDLPGNDFNAIFRSLP---IENVDGV-CFINGVPGSFYGRLLFPRNTLHFIHSSYSYLMNLSQVPIGIE
NtPNMT	SEFSALWPGAEAFSLKVEKLLFGKSDYQDVMLFESATYGVKVLTLDEAIQHTENGGFPP---YTEMIVHLPLGSIIPNPKKVLIIIGGIGFTL

RgANMT	YASS---NSKFSDTYHRAWFNHSTIALKRILEHKK-FENVTKLVDVGGG---LGVNLSMIASKYPHIQAINFDLPHVVDAASTPGVEH
NtOMTIII	YPKS---DPKFNDFVFNKAMINHTIVVMKKILENKKG-FENLKITLVDVGGG---LGVNLSMIASKYPHIQAINFDLPHVVDAASTPGVEH
NtCOMTII	YPKS---DPKFNDFVFNKAMINHTIVVMKKILENKKG-FENLKITLVDVGGG---LGVNLSMIASKYPHIQAINFDLPHVVDAASTPGVEH
RcEOMT	YADS---DPRFNDFVFNKAMINHTIVVMKKILENKKG-FENLKITLVDVGGG---LGVNLSMIASKYPHIQAINFDLPHVVDAASTPGVEH
MsCOMT	YHGT---DPRFNDFVFNKAMINHTIVVMKKILENKKG-FENLKITLVDVGGG---LGVNLSMIASKYPHIQAINFDLPHVVDAASTPGVEH
CbIEMT	YHGT---DPRFNDFVFNKAMINHTIVVMKKILENKKG-FENLKITLVDVGGG---LGVNLSMIASKYPHIQAINFDLPHVVDAASTPGVEH
CrSMT	YHGT---DPRFNDFVFNKAMINHTIVVMKKILENKKG-FENLKITLVDVGGG---LGVNLSMIASKYPHIQAINFDLPHVVDAASTPGVEH
CsCNMT	SREGLALNKGKIYISKTSPPPVREAYLSQFHEDFTM-FINARSQEVVPNGCMVLLRGRQCDSPDMQSCFTWELAMAIKELVSOGLID
CbSMT	S-----NKGNIYMANTCQSVLNDLFGNDFNTLFGKLSSEVIGNKCEEVPCYVMGVPGSFHGRLLFPRNSLHLVHSSYSVHWLTQAPKGLT
NtPNMT	FEMLR---YPSIEKIDIVEIDDDVVDVSRKFFPYLAANENDPRVTLVLDG---AAFVKAAQAGYDAIVDSSDPIGPAKDLFERPFEEA

RgANMT	VGGDMFESVPEGDALFMKWILHDWDSHNLKLLKNCYKALPDNGKVIIVVEAILPVKPDIDTAVVGVSOCDLIMMAQ-NPGGKERSEBEFR
NtOMTIII	VGGDMFESVPEGDALFMKWILHDWDSHNLKLLKNCYKALPDNGKVIIVVEAILPVKPDIDTAVVGVSOCDLIMMAQ-NPGGKERSEBEFR
NtCOMTII	VGGDMFESVPEGDALFMKWILHDWDSHNLKLLKNCYKALPDNGKVIIVVEAILPVKPDIDTAVVGVSOCDLIMMAQ-NPGGKERSEBEFR
RcEOMT	VGGDMFESVPEGDALFMKWILHDWDSHNLKLLKNCYKALPDNGKVIIVVEAILPVKPDIDTAVVGVSOCDLIMMAQ-NPGGKERSEBEFR
MsCOMT	VGGDMFESVPEGDALFMKWILHDWDSHNLKLLKNCYKALPDNGKVIIVVEAILPVKPDIDTAVVGVSOCDLIMMAQ-NPGGKERSEBEFR
CbIEMT	VGGDMFESVPEGDALFMKWILHDWDSHNLKLLKNCYKALPDNGKVIIVVEAILPVKPDIDTAVVGVSOCDLIMMAQ-NPGGKERSEBEFR
CrSMT	VGGDMFESVPEGDALFMKWILHDWDSHNLKLLKNCYKALPDNGKVIIVVEAILPVKPDIDTAVVGVSOCDLIMMAQ-NPGGKERSEBEFR
CsCNMT	EDKLDTFNHSYFASLEEVKDIVERDGSFTIDHIEGFDLDSVEMQENDK---WVRGE--KFTKVVRAFTEPIISNQFGEIMDKLYDKFT
CbSMT	EEKMKFNTHQYTPSPTEVEABILKEGSPFDHIEEASEYIWSSTKTDGDDGGSVEEYGYNVRCMRAVAEPLLDHDFGEATIEVDVFHRYK
NtPNMT	WAKALRP---GQVCTQAESIWLHMHIKQIIANCRQVFKGSVNYAWTTPTYPTGVIGYMLCSTEGPEVDFKNFVNHDKENTQVKS

RgANMT	BLAIGAGFGKINFAACVONLHIMEERK--
NtOMTIII	ALATEAGFGKGNLICVONFWMEERK--
NtCOMTII	ALATEAGFGKGNLICVONFWMEERK--
RcEOMT	DLANAAGFSAIKYECGLSSYLVRMEERK--
MsCOMT	DLAKGAGFGKQVHONAFNTYIMEERK--
CbIEMT	ALAMASFGFGKVASCAFNTYIMEERK--
CrSMT	ALVAEAGFGKIRKVCVCCDLVMEERK--
CsCNMT	HIVVSD-LEAKLEKTTSIILVLSKIDG--
CbSMT	LLIIR-MSKEKTKFINVIVSLIRKSD--
NtPNMT	LGPLKFYNSDIHKAALIFPSFARSMIES-

Abb. 18: Sequenzvergleich der ANMT mit ausgewählten annotierten MTN

Das Alignment wurde unter Verwendung von ClustalW erstellt. Identische Aminosäuren (in mindestens 50 % der Sequenzen) sind schwarz unterlegt. Als Substitutionssmatrix diente Blossum69. Die nach Joshi und Chiang (1998) vorgeschlagenen Sequenzmotive und deren Bereiche sind über den Sequenzen durch entsprechende Buchstaben und Striche gekennzeichnet.

[*Ruta graveolens* RgANMT(DQ884932), *Nicotiana tabacum* NtOMTII (AF484252), *Nicotiana tabacum* NtOMT III (X71430), *Rosa chinensis* RcEOMT (AB086103), *Medicago sativa* MsCOMT (M63853), *Clarkia breweri* CbIEMT (U86760), *Catharanthus roseus* CrSMT (DQ084384), *Camellia sinensis* CsCNMT (AB031280), *Clarkia breweri* CbSMT (AF133053) und *Nicotiana tabacum* NtPNMT (D28506)]

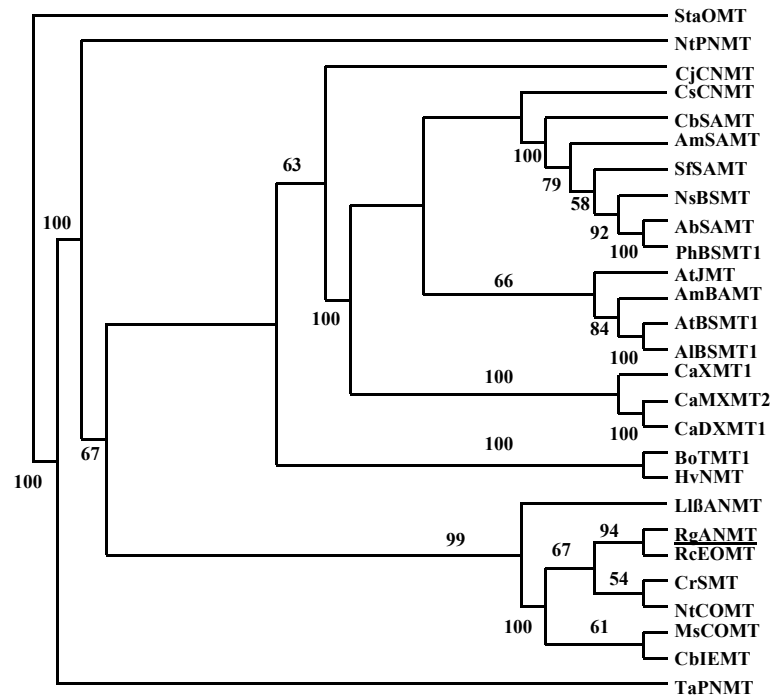


Abb. 19: Phylogenetische Einordnung der RgANMT

Die phylogenetische Entwicklung wurde unter Verwendung von Aminosäuresequenzen mit dem Programm DAMBE (Xia und Xie, 2001) untersucht. Zur Berechnung wurde ein parsimonischer Berechnungsalgorithmus unter Verwendung eines Bootstraps mit 1000 Wiederholungen gewählt. Die Auswahl der Sequenz erfolgte dabei rein zufällig. Für den Stammbaum wurden nur Werte > 50 % angegeben. Die Darstellung des Stammbaums erfolgte mit dem Programm TreeView.

[*Streptomyces alboniger* StaOMT (M74560); *Nicotiana tabacum* NtPNMT (D28506); *Coptis japonica* CjCNMT (AB061863) *Camellia sinensis* CsCNMT (AB031280); *Clarkia breweri* CbSAMT (AF133053); *Antirrhinum majus* AmSAMT (AF515284); *Stephanotis floribunda* SfSAMT (AJ308570); *Nicotiana suaveolens* NsBSMT (AJ628349); *Atropa belladonna* AbSAMT (AB049752); *PhBSMT1* (AY233465); *Arabidopsis thaliana* JMT (AY008434); *Antirrhinum majus* AmBAMT (AF198492); *Arabidopsis thaliana* BSMT1 (AY224595); *Arabidopsis lyrata* AIBSMT1 (AY224596; mRNA); *Coffea arabica* CaXMT1 (AB048793); *Coffea arabica* CaMXMT2 (AB084126); *Coffea arabica* CaDXMT1 (AB084125); *Brassicae oleraceae* BoTMT1 (AF387793); *Hordeum vulgare* HvNMT (U54767); *Limonium latifolium* LiBANMT (AY216903); *Ruta graveolens* RgANMT (DQ884932); *Rosa chinensis* RcEOMT (AB086103); *Catharanthus roseus* CrSMT (DQ084384); *Nicotiana tabacum* NtCOMT (X71430); *Medicago sativa* MsCOMT (M63853); *Clarkia breweri* CbIEMT (U86760) und *Triticum aestivum* TaPNMT (AY065971)]

Die phylogenetische Entwicklung der *Ruta graveolens* ANMT wurde mit dem Programm DAMBE abgeleitet (Abb. 19). Als Outgroup diente die *O*-Demethylpuromycin-*O*-Methyltransferase aus *Streptomyces alboniger* (M74560).

Die ANMT aus *Ruta graveolens* wird dabei deutlich in die Gruppe der *O*-Methyltransferasen eingeordnet, obwohl es sich bei dem Enzym um eine *N*-Methyltransferase handelt. Das scheint auch für eine *S*-Methyltransferase aus *Catharanthus roseus* (Coiner *et al.*, 2006) und die β -Alanin *N*-Methyltransferase aus *Limonium latifolium* (Choi *et al.*, 2001; Choi *et al.*,

2002) zu gelten. Die RgANMT bildet ein „Cluster“ zusammen mit der Eugenol-*O*-Methyltransferase aus *Rosa chinensis* var. *spontanea* (AB086103).

Im Gegensatz dazu bilden die an der Biosynthese von Koffein beteiligten *N*-Methyltransferasen aus *Coffea arabica* (CaXMT1, CaMXMT1 und CaDXMT1; Uefuji *et al.*, 2003) eine weit entfernte Gruppe, die mit den hier ebenfalls gezeigten *N*-Methyltransferasen aus *Coptis japonica* (CjCNMT; AB061863) und der Koffeinsynthase aus *Camellia sinensis* (CsCNMT; AB031280), sowie einer Gruppe von Carboxyl-MTn verwandt sind.

D. 4 Heterologe Expression der rekombinanten ANMT

Die Identität der ANMT ließ sich nur über die funktionelle Expression beweisen. Erste Versuche, die Expression im pET101-System der Firma Invitrogen in *E. coli* durchzuführen, schlugen allerdings fehl. Auch Versuche, mögliche Fehlerquellen der Expression nach Angaben des Herstellers auszuschließen, führten nicht zum Erfolg. Bereits die Expression anderer MTn in diesem System schlugen in unserem Labor fehl (M. Hehmann und L. Burga persönliche Mitteilung). Die Gründe dafür konnten abschließend nicht geklärt werden, könnten aber im Vektor liegen.

Nach diesen Erfahrungen wurde zum Expressionsvektor pET15b (Novagen) gewechselt. Dieser Vektor kodiert vor der multiplen Cloning Site ein Hexahistidin, das dem exprimierten Produkt ein N-terminales „His-Tag“ voranstellt. Dieses His-Tag macht eine spätere Reinigung des Proteins mit Metallchelatchromatographie möglich. Da innerhalb der ANMT-Basensequenz keine Schnittstellen für *NdeI* und *BamHI* enthalten sind, konnte die cDNA über diese Schnittstellen in den pET15b-Vektor kloniert werden. Die erfolgreiche Ligation der ANMT-Sequenz in den pET15b-Vektor wurde zunächst durch einen Restriktionsverdau geprüft. Außerdem wurde durch eine Sequenzierung sicher gestellt, dass es während der Klonierung zu keinerlei Leserasterverschiebungen gekommen war und die Sequenz die richtige Orientierung besaß.

Die Expression der rekombinanten ANMT fand dann im *E. coli* Stamm BL21 statt. Eine Induktion mit IPTG für 4 h bei 37 °C führte zu einer ausreichenden Expression und der größte Teil des Proteins befand sich nach dem Aufschluss der Zellen durch Ultraschall in der löslichen Fraktion. Erste Inkubationen mit dem Rohextrakt und Anthranilat mit Methyl- $[^{14}\text{C}]$ -SAM lieferten ein Produkt, wohingegen Kontrollinkubationen ohne Substrat oder ohne Enzym bzw. mit denaturiertem Enzym (5 min bei 95°C) kein Produkt zeigten. Auch Extrakt aus *E. coli* BL21, die mit dem reinen pET15b-Vektor transformiert waren, zeigten keine Produktbildung.

Eine Überprüfung der Expression fand mit SDS-PAGE statt (Abb. 20). Im Rohextrakt aus induzierten Transformanten (Spur 2) ist eine starke Bande von ca. 40 kDa zu erkennen, die nach Transformation der Zellen mit „leerem“ Vektor (Spur 1) fehlte. Das rekombinant exprimierte Protein ließ sich problemlos durch Metallchelatchromatographie reinigen (Spur 4). In Spur 3 ist der Durchlauf einer Metallchelatchromatographie aufgetragen. In der 4. Spur ist das Eluat der Metallchelatchromatographie gezeigt, das nach spezifischer Elution der ANMT von der Säulenmatrix durch Imidazol erhalten wurde. Anhand dieser beiden Spuren

wird deutlich, dass eine Aufreinigung des Enzyms mit Metallchelatchromatographie möglich ist. Für einen Größenvergleich diente der in Spur 5 aufgetrennte Größenmarker.

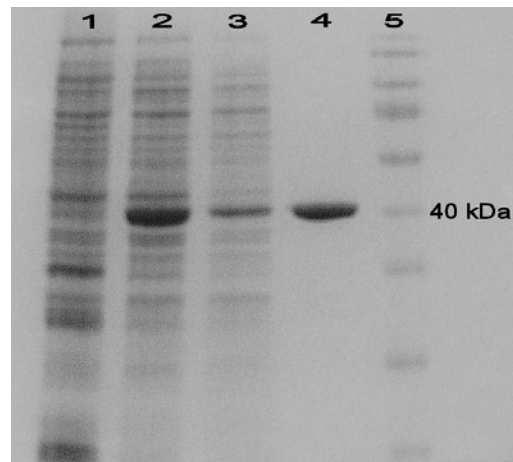


Abb. 20: Kontrolle der Expression und Reinigung der ANMT durch SDS-PAGE

Die Rohextrakte (je 10 µg Protein) von *E. coli* BL21, transformiert mit ANMT cDNA (Spur 2) oder leerem Vektor (Spur 1), sowie der Durchlauf (je 5 µg, Spur 3) und die Imidazol eluierte Enzymfraktion (Spur 4) nach Metallchelatchromatographie wurden in 12,2 % Polyacrylamidgel in Gegenwart von SDS aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Zum Größenvergleich (Spur 5) diente die Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, St. Leon Roth).

D. 5 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten ANMT

D. 5.1 Produktidentifizierung durch Radio- Dünnschichtchromatographie

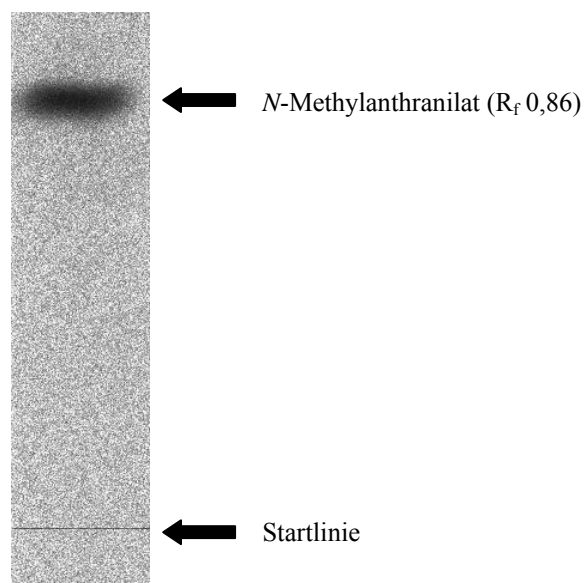


Abb. 21: Radio-Dünnschichtchromatographie des Extraktes einer ANMT-Inkubation

Das rekombinant gereinigte Enzym wurde mit Anthranilat und [Methyl- ^{14}C]-SAM inkubiert, die Inkubation anschließend mit Ethylacetat extrahiert und der Extrakt auf Cellulose F_{254} Platten mit Ethanol/konz. Ammoniak/Wasser als Laufmittel im Verhältnis 80/4/16 aufgetrennt. Als Endprodukt konnte eine einzelne Bande mittels Phosphorimager detektiert werden, die mit nicht radioaktiv markiertem *N*-Methylantranilat comigrierte.

Zum Nachweis der Enzymaktivität wurde das Produkt aus Inkubationen der rekombinant exprimierten ANMT zunächst dünnschichtchromatographisch identifiziert (Abb. 21). Es wurde nur ein Produkt beobachtet, welches mit einem Bio Imager FLA-2000 (Fuji, Tokyo, Japan) lokalisiert wurde. Nicht radioaktiv markierte Vergleichssubstanzen von *N*-Methylantranilat sowie Anthranilat wurden unter UV-Bestrahlung (294 nm und 314 nm) detektiert. Das radioaktive Endprodukt der Enzymreaktion (R_f 0,86) comigrierte dabei mit dem *N*-Methylantranilatstandard.

D. 5.2 Produktidentifizierung mittels HPLC

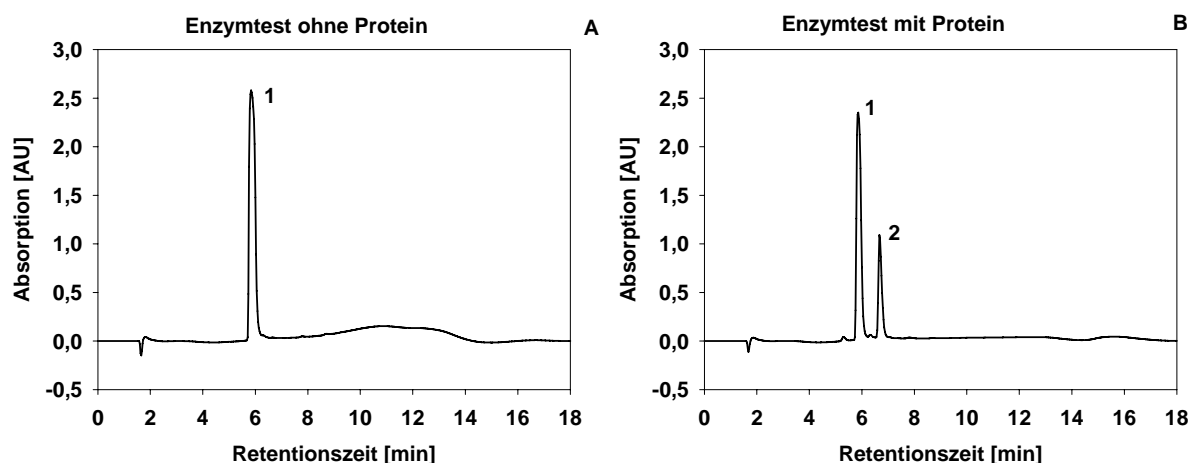


Abb. 22: HPLC-Trennungen zu ANMT-Inkubationen

Für die HPLC-Auftrennung diente eine Methode nach Wang und DeLuca (2005). Die Detektion fand bei 340 nm statt.

Teil A: Auftrennung des Extraktes aus einer ANMT-Inkubation ohne Enzym (Substanz 1, Anthranilat, Rt 5,92 min); Teil B: Auftrennung des Extraktes aus einer vollständigen ANMT-Inkubation (Substanz 1, Anthranilat, Rt 5,92 min; Substanz 2, *N*-Methylantranilat, Rt 6,72 min)

Die Identifizierung des Produktes der ANMT-Inkubationen mit Anthranilat und SAM als Substrat wurden auch durch HPLC durchgeführt. Authentisches Anthranilat und *N*-Methylantranilat dienten als Referenz mit Retentionszeiten von 5,92 und 6,72 min. Nach Inkubationen ließen sich zwei Substanzen trennen (Abb. 22, Teil B), die als Anthranilat und *N*-Methylantranilat charakterisiert wurden, wobei das letztere in Kontrollinkubationen (Abb. 22; Teil A) ohne Enzym bzw. mit denaturiertem Enzym (5 min bei 95 °C) oder ohne SAM fehlte. Enzymtests ohne Anthranilat, sowie ohne Anthranilat und SAM wiesen nur die Basislinie auf. Zusätzlich zeigte das Dioden-Array-Spektrum (DAD) für die Substanz 2 ein bathochrom verschobenes Absorptionsspektrum bei 350 nm gegenüber ca. 330 nm für Anthranilat (Abb. 22), was für *N*-Methylantranilat typisch ist. Zum Ausschluss anderer Methylierungsprodukte wurden auch Anthranilatmethylester (Rt 7,20 min) und *N*-Methylantranilatmethylester (Rt 8,31 min) durch HPLC charakterisiert. Die letzte Substanz enthielt noch kleine Mengen von *N*-Methylantranilat (Rt 6,80), was als „interner Standard“ nützlich war. Das UV-Spektrum des Anthranilatmethylesters ähnelte dem von Anthranilat, wohingegen das von *N*-Methylantranilatmethylester dem von *N*-Methylantranilat (λ_{max} 350 nm) entspricht (Abb. 22).

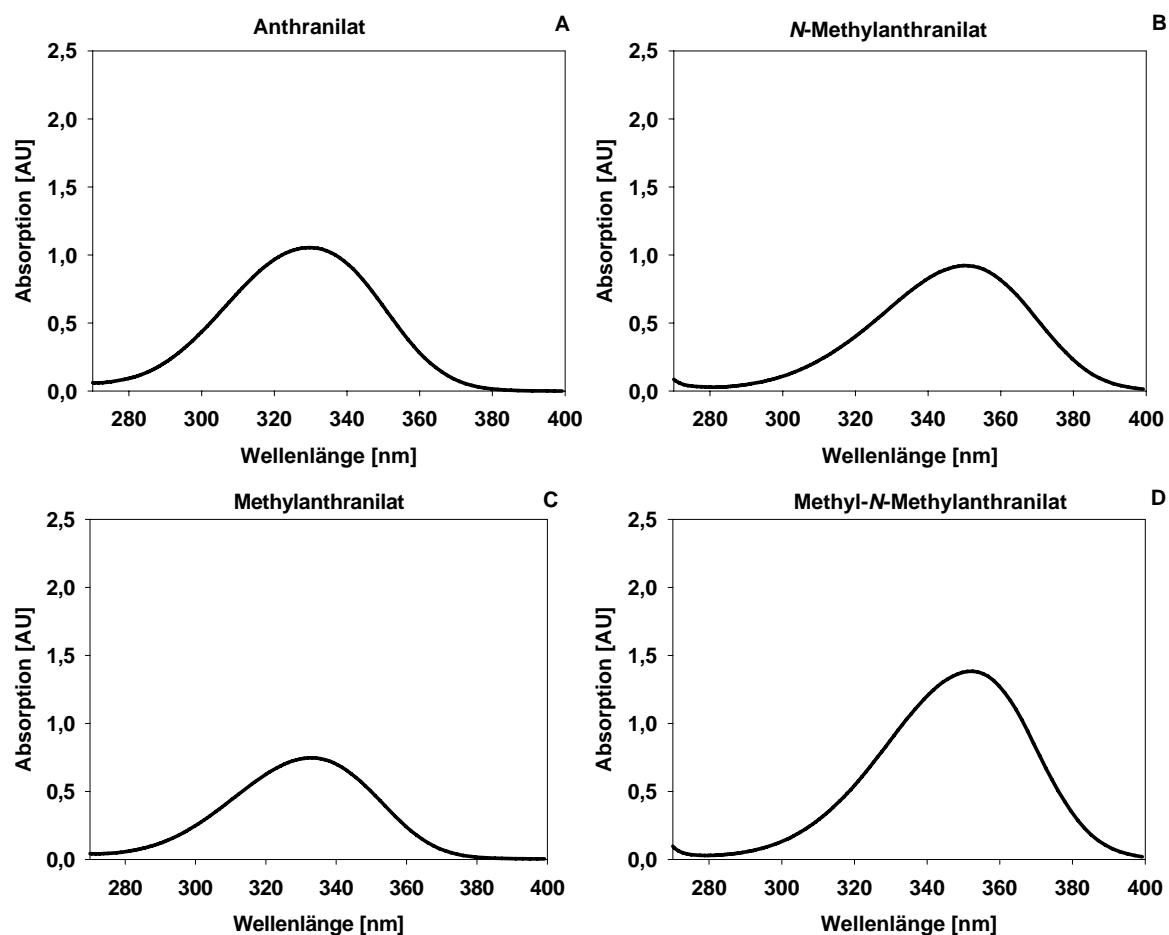
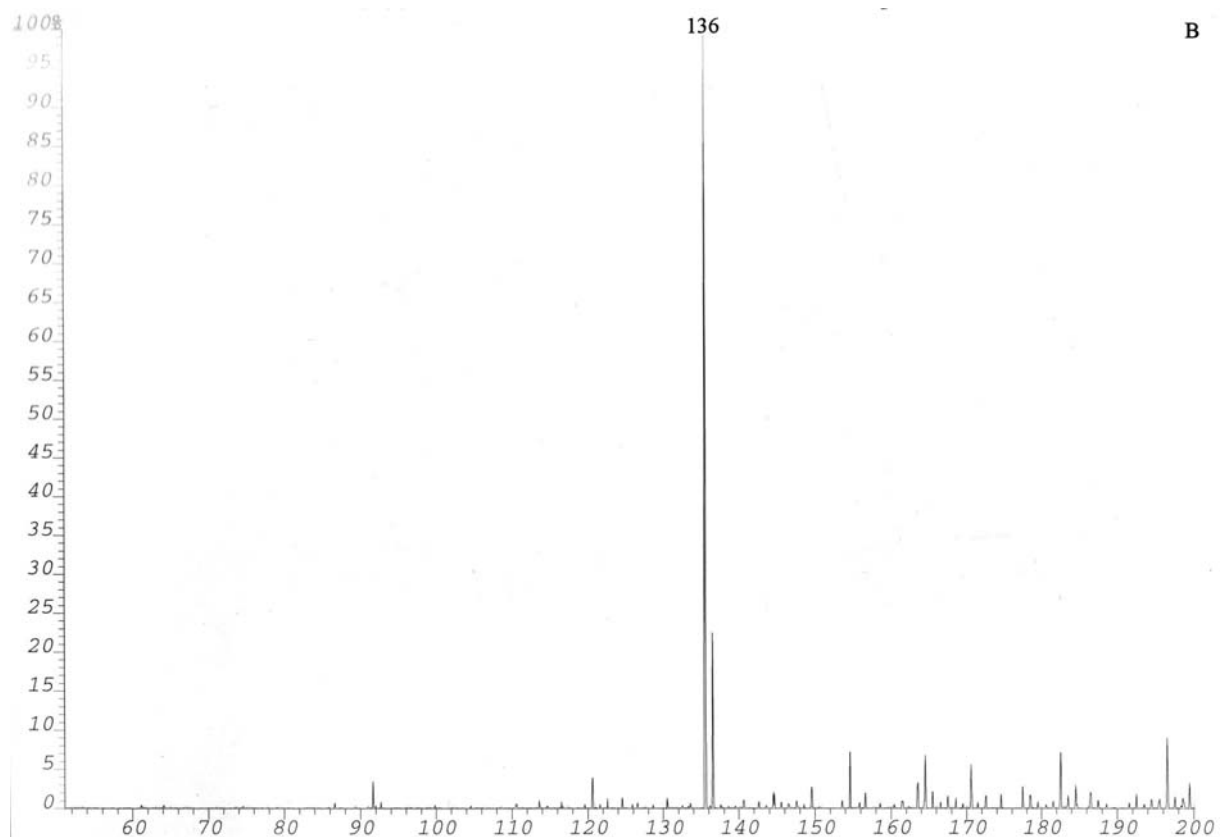
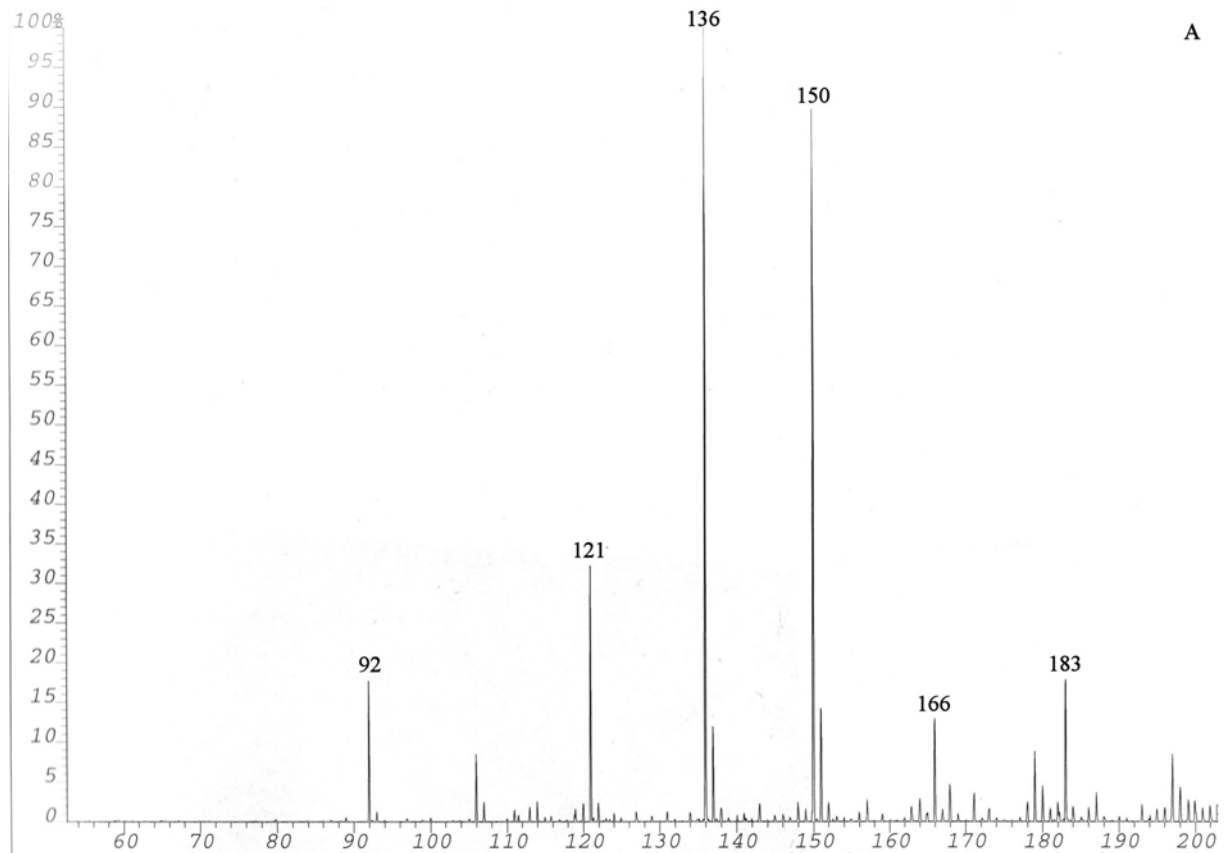


Abb. 23: UV-Spektren von Standards gemessen durch DAD im Eluat

(A) Anthranilat, (B) *N*-Methylantranilat, (C) Methylantranilat und (D) Methyl-*N*-Methylantranilat

D. 5.3 Produktidentifizierung mittels Massenspektrometrie



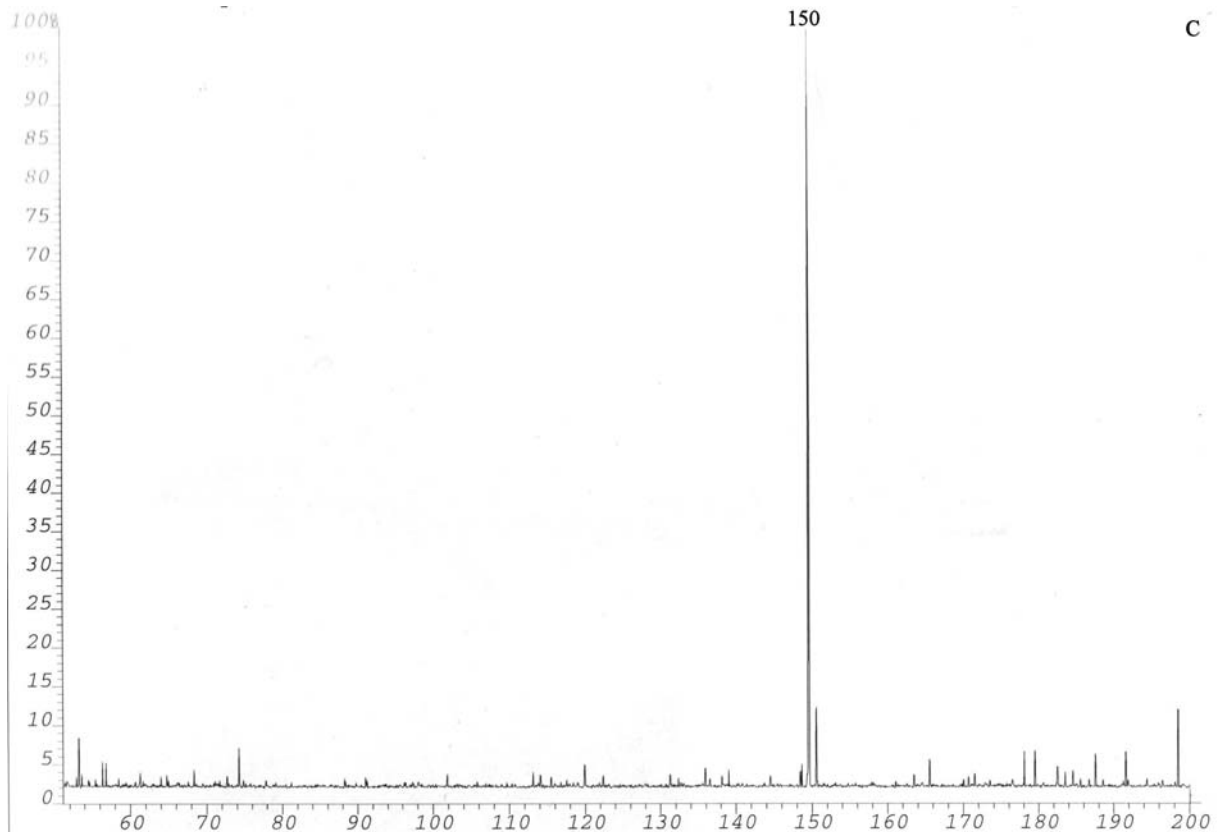


Abb. 24: Produktidentifizierung durch Massenspektrometrie

Die Durchführung der Massenspektrometrie wurde am Institut für Pharmazeutische Chemie unter der Leitung von Frau Dr. Laufenberg durchgeführt.

Teil A: Die Abbildung zeigt ein negatives ES mit einer Probe nach der Durchführung eines RgANMT-Enzymtests unter Verwendung von Anthranilat als Substrat. Die Peaks bei 136 Da und 150 Da weisen darauf hin, dass kein Vollumsatz zum Endprodukt ablief.

Teil B: Die Abbildung zeigt ein negatives ES des Anthranilatstandards (Peak bei 136 Da).

Teil C: Die Abbildung zeigt ein negatives ES des *N*-Methylantranilatstandards (Peak bei 150 Da).

Zur endgültigen Produktcharakterisierung wurde die Massenspektroskopie gewählt. Authentisches Anthranilat und *N*-Methylantranilat zeigten Molekularionen $[M^+]$ von m/z 136 (Abb. 24; B) bzw. m/z 150 (Abb. 24; C). Der Extrakt aus ANMT-Inkubationen wies beide Fragmentationen als dominante Signale auf (Abb. 24; A), was den Umsatz von weniger als der Hälfte des Substrates Anthranilat entspricht.

D. 5.4 Relative Molekularmasse der rekombinanten ANMT

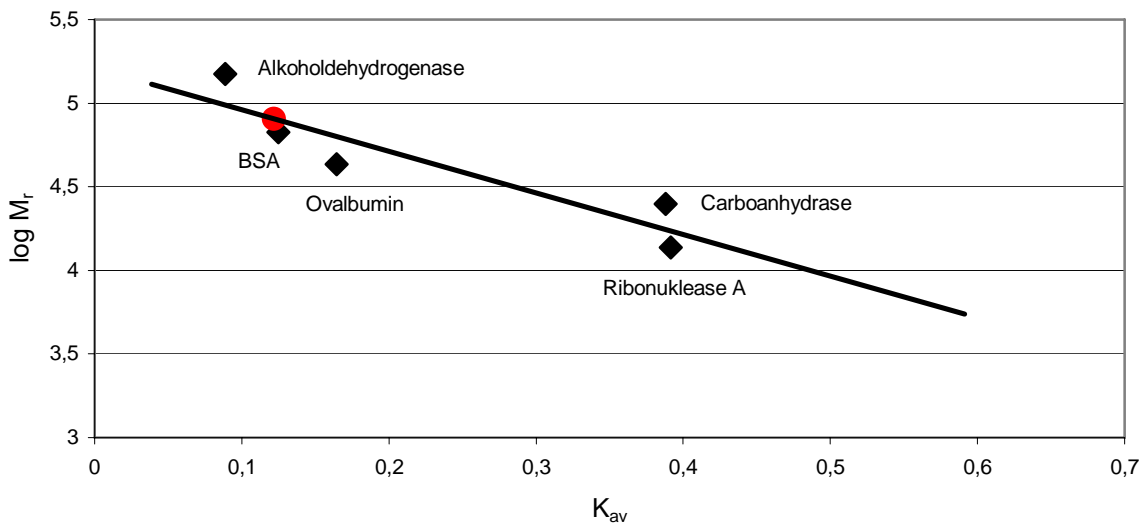


Abb. 25: Elution der RgANMT (roter Punkt) von einer kalibrierten Fractogel SEC-Säule

Für globuläre Proteine besteht bei einer GPC ein linearer Zusammenhang zwischen dem Elutionsvolumen (V_e) und dem Logarithmus der relativen Molmasse, so dass eine Größenbestimmung im Vergleich zu charakterisierten Referenzproteinen möglich ist.

Im Unterschied zur SDS-PAGE liegt hier das Enzym in nativer Konformation vor. Die Elution der rekombinanten ANMT erfolgte nach der Alkoholdehydrogenase (150 kDa) und vor BSA (67 kDa) (Abb. 25). Der Verteilungskoeffizient (K_{av}) wurde zu 0,12 berechnet und korreliert mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 80 kDa. Die Methode erlaubt zwar nur eine ungefähre Aussage (± 5 kDa), aber unter Berücksichtigung der Ergebnisse der SDS-PAGE (Abb. 20) müsste es sich um ein Homodimer handeln.

D. 5.5 pH-Abhängigkeit

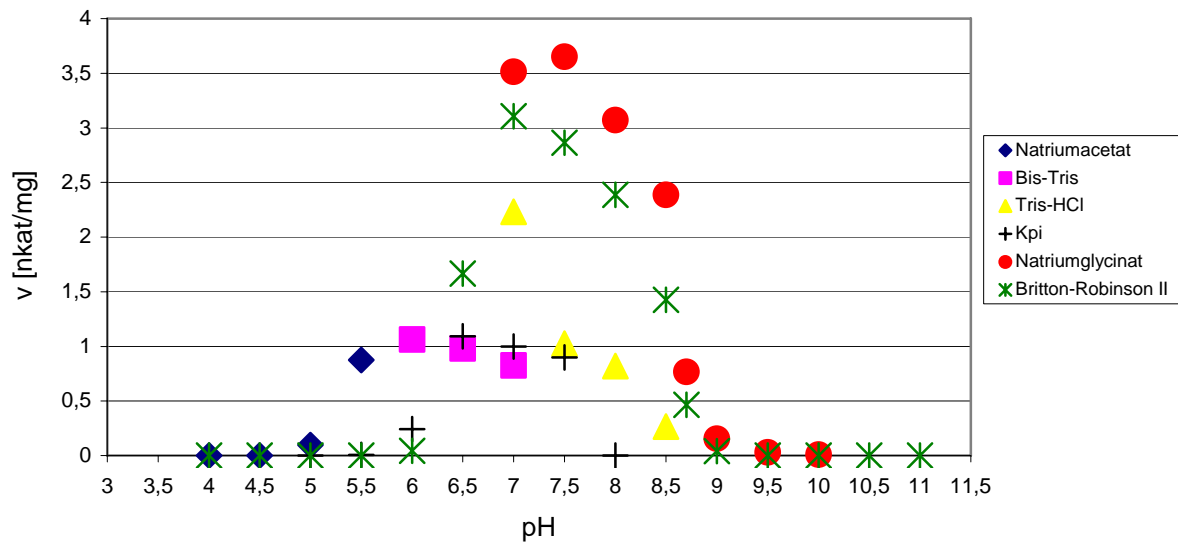


Abb. 26: Aktivität der rekombinanten ANMT in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Messungen erfolgten bei 32 °C für 30 min in 200 mM Puffern mit 0,05 µg der gereinigten ANMT. Jeder Messpunkt bildet das Mittel aus zwei voneinander unabhängigen Messungen.

Die Enzymaktivität war abhängig vom pH mit einem breiten Maximum zwischen 7,0 und 8,0 und wurde aber auch von der Pufferqualität beeinflusst. Die höchste Enzymaktivität wurde in 200 mM Natriumglycinatpuffer pH 7,5 sowie in Britton-Robinson II Puffer pH 7,0 gemessen, wohingegen die Aktivität in Tris-HCl pH 7,0 etwas geringer war (Abb. 26). Für die weiteren Messungen wurde routinemäßig Tris-HCl-Puffer pH 7,0 verwendet, da so ein besserer Vergleich zu Literaturdaten möglich ist. Alle Ergebnisse zeigen aber, dass im Gegensatz zu früheren Messungen pflanzlichen Rohextraktes die maximale Aktivität mit der rekombinanten ANMT bei neutralen bis schwach basischen pH-Werten erzielt wird.

D. 5.6 Temperaturabhängigkeit

Die Messungen fanden in 200 mM Tris-HCl pH 7,0 mit 0,05 µg gereinigter rekombinanter ANMT statt (Abb. 27). Der pH-Wert (7,0) wurde für jede Temperatur von 15 °C bis 50 °C kontrolliert, um die für Tris-HCl bekannte pH-Abweichung evtl. auszugleichen. Die Aktivität stieg von 15 °C bis auf ein Plateau bei 25 bis 32 °C leicht an. Die höchste Enzymaktivität wurde bei 37 °C erreicht und fiel dann bis 50 °C wieder ab. Alle weiteren Messungen wurden bei 35 °C zur Schonung des Enzyms durchgeführt.

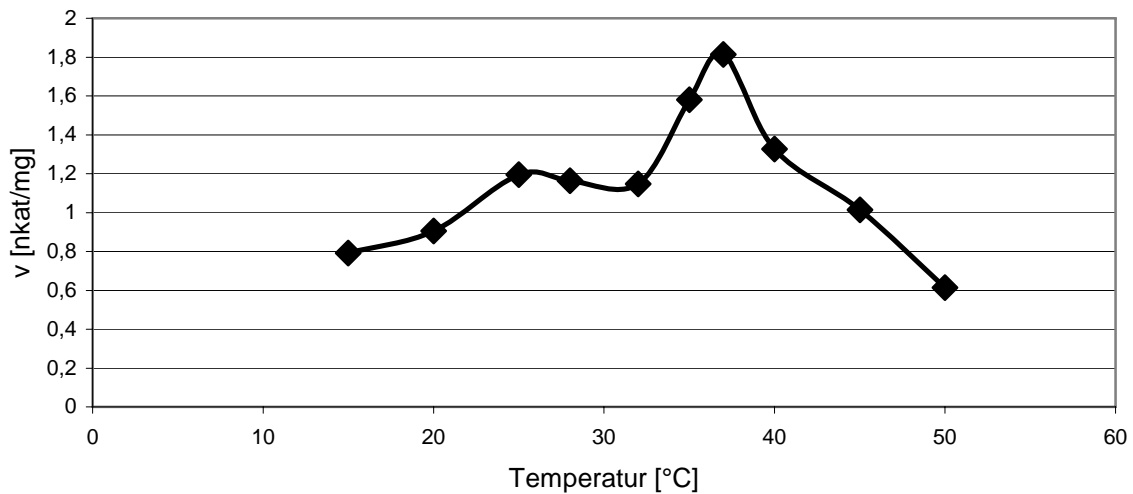


Abb. 27: Aktivität der rekombinanten ANMT in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur

Die Messungen erfolgten für 30 min in 200 mM Tris-HCl pH 7,0 mit 0,05 µg der gereinigten ANMT bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Messpunkte bilden das Mittel aus zwei unabhängigen Messungen.

D. 5.7 Zeitlinearität

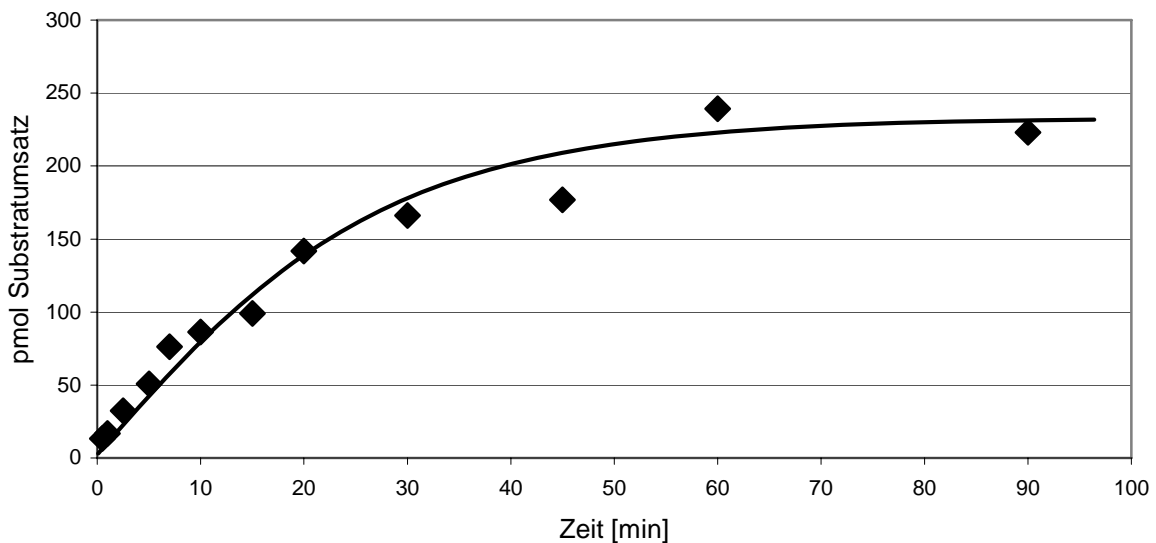


Abb. 28: Aktivität der rekombinanten ANMT in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Die Messungen erfolgten bei 35 °C in 200 mM Tris-HCl pH 7,0 mit 0,05 µg gereinigter rekombinanter ANMT für unterschiedliche Inkubationszeiten. Die Messpunkte bilden das Mittel aus zwei voneinander unabhängig durchgeführten Messungen.

Unter den gewählten Bedingungen war ein linearer Anstieg der Enzymaktivität über einen Zeitraum von ca. 30 min zu beobachten. Bei Inkubationen über 30 min erreichte die Enzymaktivität ein Plateau wofür ein Verlust von Enzym, Verarmung an Substrat oder

Produktinhibierung verantwortlich sein kann (siehe Abb. 28). Für die weiteren Inkubationen wurde eine Zeitspanne von 20 min je Testansatz gewählt.

D. 5.8 Proteinlinearität

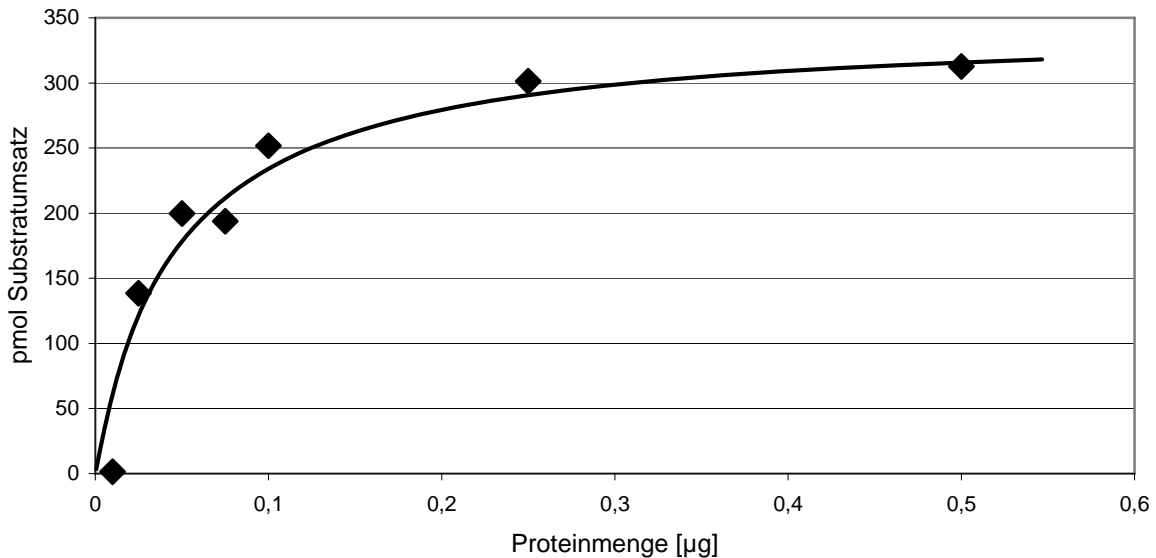


Abb. 29: Aktivität der rekombinanten ANMT in Abhängigkeit von der Proteinmenge

Die Messungen erfolgten für 20 min bei 35 °C mit 0,05 µg gereinigter rekombinanter ANMT mit unterschiedlichen Proteinmengen. Jeder Messpunkt bildet das Mittel aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen.

Unter den gewählten Bedingungen stieg die Aktivität der ANMT bis zu einer Proteinmenge von 0,1 µg Protein im Testansatz an und näherte sich dann einer stetigen Umsatzrate (Abb. 29). Für die weiteren Tests ergab sich daraus, dass stets eine Proteinmenge von 0,05 µg des über Metallchelatchromatographie gereinigten rekombinanten Enzyms eingesetzt wurde.

D. 5.9 Einfluss von Metallionen auf die ANMT-Aktivität

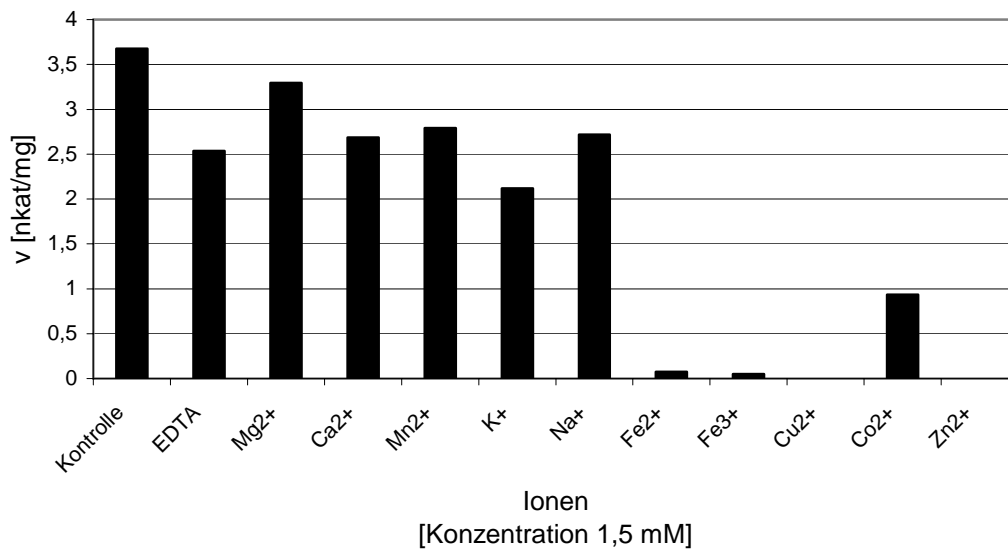
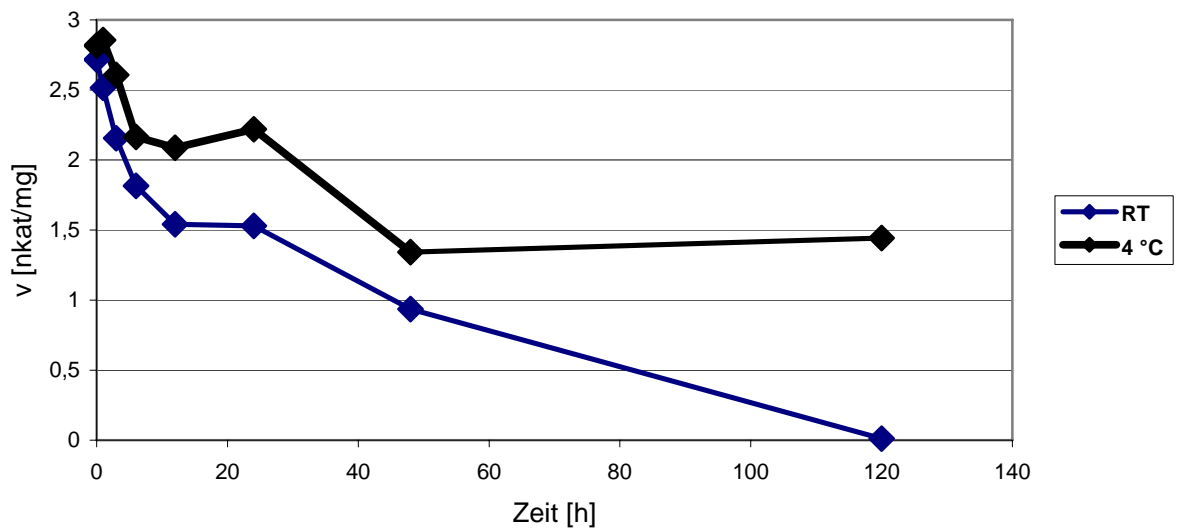


Abb. 30: Aktivität der rekombinanten ANMT in Abhängigkeit von verschiedenen Metallionen

Die Messungen erfolgten für 20 min bei 35 °C in 200 mM Tris-HCl pH 7,0 mit 0,05 µg gereinigtem rekombinantem Protein. Jeder Testansatz enthielt zusätzlich 1,5 mM Metallsalz. Jeder Messpunkt bildet ein Mittel aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Als Kontrolle diente ein Standardenzymtest.

Der Einfluss von jeweils 1,5 mM Metallsalzen auf die Enzymaktivität wurde im Vergleich zur Aktivität unter Standardbedingungen gemessen (Abb. 30). Durch MgCl₂, CaCl₂, MnCl₂ oder NaCl konnte nur eine geringe Abnahme der Enzymaktivität festgestellt werden, wohingegen ein Zusatz von FeSO₄, Fe₂(SO₄)₃, CuSO₄ und ZnCl₂ die Enzymaktivität vollständig hemmte. Auch durch CoCl₂ war eine Abnahme der Aktivität auf 20 % im Vergleich zur Kontrolle gegeben, sie fiel damit jedoch geringer aus als durch FeSO₄, Fe₂(SO₄)₃, CuSO₄ und ZnCl₂. In Gegenwart von KCl oder EDTA, das zur Komplexbildung von Ionen diente, sank die Aktivität um etwa ein Drittel zur Kontrolle.

D. 5.10 Stabilität der ANMT**Abb. 31: Stabilität der ANMT**

Die Aktivität des bei Raumtemperatur (schwarze Linie) oder 4 °C (blaue Linie) gelagerten Enzyms wurde nach unterschiedlichen Zeitabständen im Standard-Enzymtest überprüft. Pro Messpunkt wurden 0,05 µg Enzym eingesetzt und für 20 min bei 35 °C inkubiert. Jeder Messpunkt repräsentiert das Mittel aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen.

Die Lagerung des Enzyms bei Raumtemperatur oder 4°C führte zu einem graduellen Verlust der Aktivität (Abb. 31). Für das bei 4 °C gelagerte Enzym war jedoch auch noch nach 2-5 Tagen eine signifikante Aktivität messbar, während das bei Raumtemperatur gelagerte Enzym keinerlei Aktivität mehr zeigte.

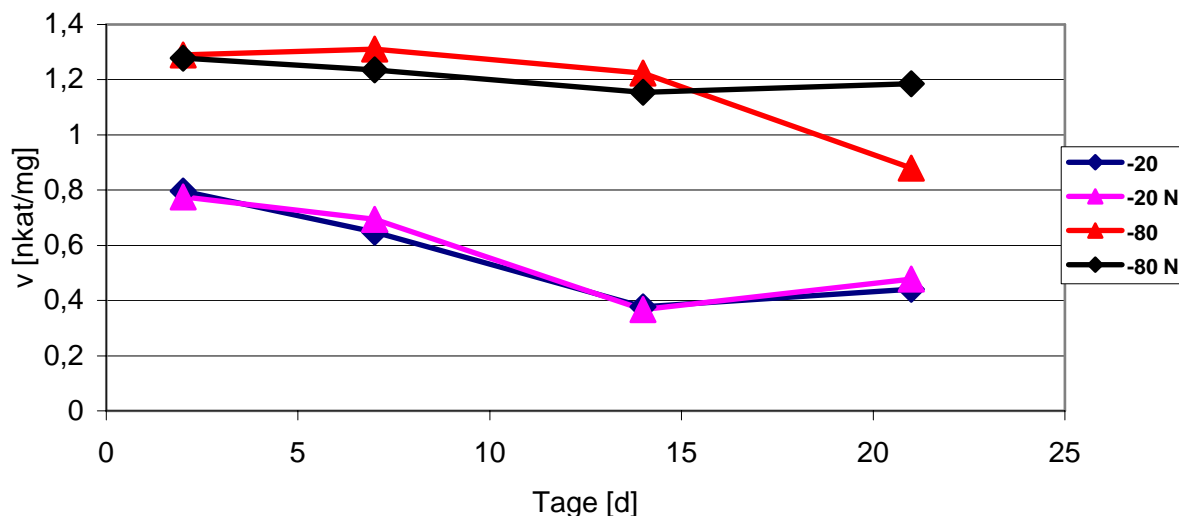


Abb. 32: Einfluss des Einfrierens auf die ANMT-Aktivität

Die Aktivität des bei -20 °C und -80 °C mit und ohne Schockgefrieren gelagerten Enzyms wurde nach unterschiedlichen Zeitabständen in Standardenzymtests überprüft. Pro Messpunkt wurden $0,05\text{ }\mu\text{g}$ Enzym eingesetzt und für 20 min bei 35 °C inkubiert. Jeder Messpunkt repräsentiert das Mittel aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen.

Die Lagerung des Enzyms bei -80 °C war günstiger zum Erhalt der Aktivität als bei -20 °C (Abb. 32). Dabei machte es keinen Unterschied, ob das Enzym schnell in flüssigem Stickstoff oder relativ langsam in der Kühltruhe eingefroren worden war. Die Enzymaktivitäten blieben über den Lagerungszeitraum von 3 Wochen relativ konstant. Nach 6 Monaten (Daten nicht gezeigt) hatte die bei -80 °C gelagerte Probe immer noch fast konstante Aktivität, wobei die in flüssigem Stickstoff eingefrorene Probe einen höheren Umsatz zeigte. Bei -20 °C war nach 6 Monaten keine Aktivität mehr messbar. Für Enzymtests wurde bei -80 °C gelagertes Enzym verwendet.

Tab. 8: ANMT-Aktivität nach mehrmaligem Einfrieren

Die Kontrolle (spezifische Aktivität $2,1\text{ nkat/mg}$) wurde mit 100 % Aktivität gleichgesetzt. Die Messungen wurden für 20 min bei 35 °C mit einer Proteinmenge von $0,05\text{ }\mu\text{g}$ durchgeführt. Es wurden stets Doppeltests je Messung durchgeführt.

Behandlung	Relative ANMT-Aktivität (%)
Kontrolle	100
Einfrieren 1x	81
Einfrieren 3x	48
Einfrieren 5x	47
Einfrieren 10x	35

Das in 200 mM Tris-HCl pH 7,0 gelagerte Enzym wurde mehrmals in flüssigem Stickstoff eingefroren, wieder aufgetaut und die restliche Enzymaktivität gemessen (Tab. 8). Schon nach einmaligem Einfrieren konnte eine um 20 % geringere Aktivität im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Nach zehnmaligem Einfrieren und Auftauen trat ein Aktivitätsverlust von ca. 65 % auf. Für die Enzymtests wurde daher das Protein in kleineren Mengen aliquotiert und für Enzymtests nur einmalig in flüssigem Stickstoff eingefrorenes Protein verwendet, das bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde.

D. 5.11 K_m -Wertbestimmung für Anthranilat und SAM

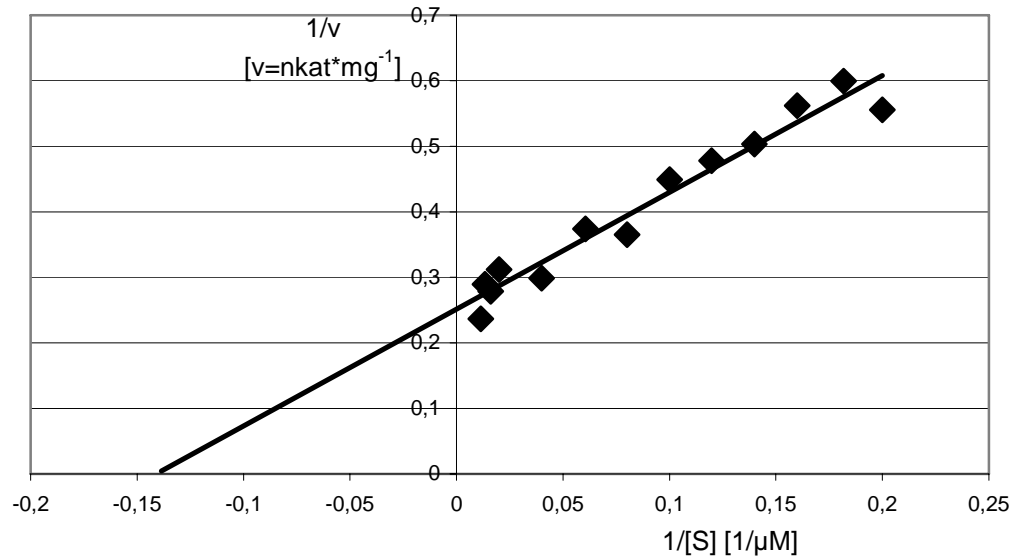


Abb. 33: Abhängigkeit der ANMT-Aktivität von der Anthranilat-Konzentration

Die Messungen der Enzymaktivität erfolgten in 200 mM Tris-HCl (pH 7,0) für 20 min bei 35 °C mit 0,05 μg gereinigtem rekombinanten Protein, 100 μM SAM und variierenden Anthranilatkonzentrationen. Die Messpunkte bilden das Mittel von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach Lineweaver und Burk.

Die graphische Auswertung nach Lineweaver and Burk ergab einen K_m -Wert für Anthranilat von 7,1 μM (Abb. 33). Die analogen Messungen für SAM zeigten einen K_m -Wert von 3,3 μM (Abb. 34). Ab einer SAM-Konzentration von 10 mM wurde eine Hemmung der Enzymaktivität beobachtet, die möglicherweise auf das in der Reaktion entstehende SAH zurückzuführen ist. Aus den K_m -Wert-Bestimmungen ergibt sich eine V_{max} für Anthranilat von 3,98 nkat/mg und für SAM von 2,32 nkat/mg.

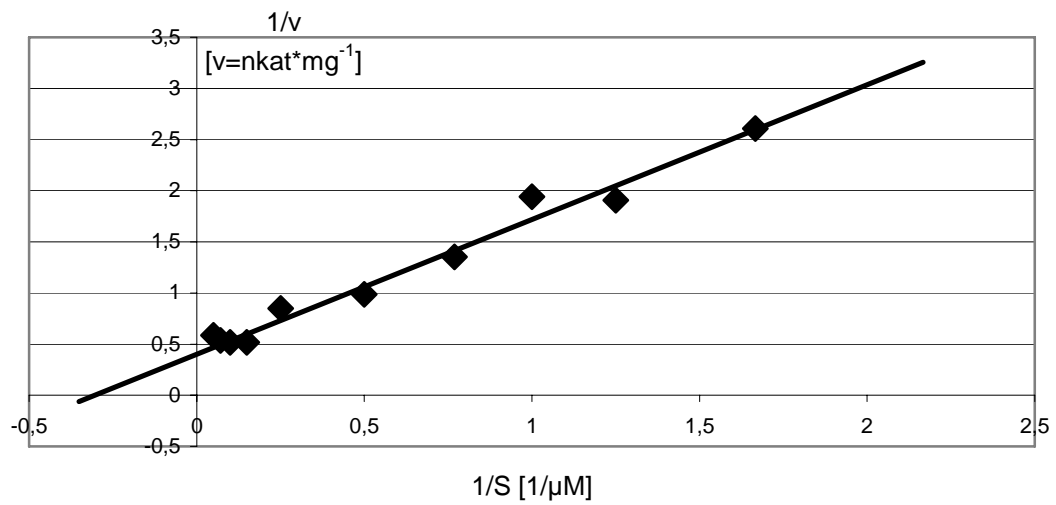


Abb. 34: Abhängigkeit der ANMT-Aktivität von der SAM-Konzentration

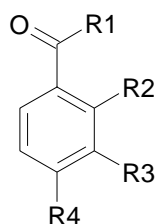
Die Messungen der Enzymaktivität erfolgten in 200 mM Tris-HCl (pH 7,0) für 20 min bei 35 °C mit 0,05 μg gereinigtem rekombinanten Protein, 250 μM Anthranilat und variierenden SAM-Konzentrationen. Die Messpunkte bilden das Mittel von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach Lineweaver und Burk.

D. 5.12 Substratspezifität

Zur Eingrenzung der Substratspezifität der ANMT wurde eine Reihe von Substraten mit struktureller Ähnlichkeit zu Anthranilat eingesetzt. Wegen der Sequenzähnlichkeit der ANMT zu COMTn wurden auch Substrate der Kaffeat-OMTn eingesetzt (Tab. 9). Darüber hinaus wurden Substrate bekannter NMTn geprüft. Keine dieser Substanzen außer Anthranilat wurde von der ANMT als Substrat akzeptiert. Eine besondere Konsequenz für die Biosynthese der Acridonalkaloide ergibt sich aus der Tatsache, dass Anthraniloyl-CoA nicht methyliert wurde. Dieses Ergebnis wurde abgesichert durch eine Kontrolle, in der zunächst das Substrat hydrolysiert wurde und dann mit der ANMT umgesetzt werden konnte.

Tab. 9: Substanzen getestet als potentielle Substrate für die ANMT

Anthranilsäure und -derivate



Anthranilsäure/2-Aminobenzoessäure:

R1=OH, R2=NH₂

2-Amino-3-methoxybenzoessäure:

R1=OH, R2=NH₂, R3=OCH₃

2-Aminobenzamid:

R1=R2=NH₂

3-Hydroxyanthranilsäure:

R1=OH, R2=NH₂, R3=OH

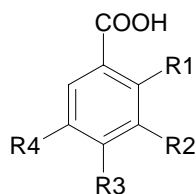
Methylantranilsäure:

R1=OCH₃, R2=NCH₃

Anthraniloyl-CoA:

R1=SCoA, R2=NH₂

Benzoessäuren



Salicylsäure:

R1=R2=R3=R4=OH

Benzoessäure:

R1=R2=R3=R4=H

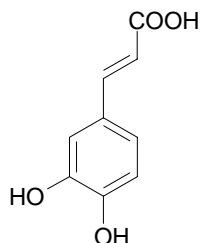
3-Aminobenzoessäure:

R4=NH₂, R1=R2=R3=H

4-Aminobenzoessäure:

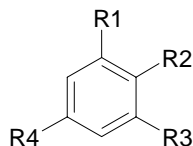
R3=NH₂, R1=R2=R4=H

Phenylpropanoid



Kaffeessäure

Phenole/Aminoalkohol



Phloroglucinol:

R1=OH, R2=H; R3=R4=OH

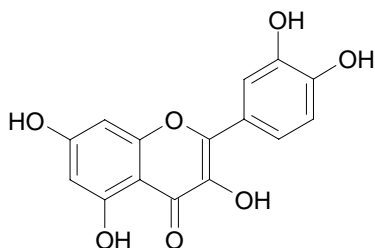
Catechol:

R1=OH; R2=OH; R3=R4=OH

2-Aminobenzylalkohol:

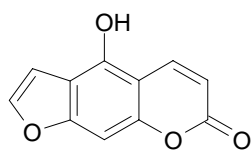
R1=CO₂H; R2=NH₂

Flavonoid



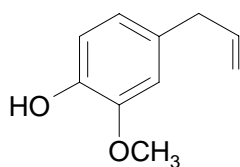
Quercetin

Cumarin



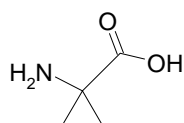
Bergapton

Phenylpropen



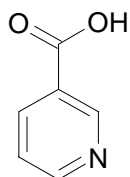
Eugenol

Carbonsäure



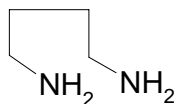
1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure (ACC)

Pyridinalkaloid



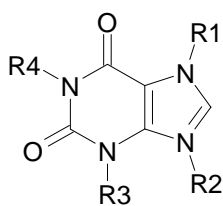
Nikotinsäure

Diamin

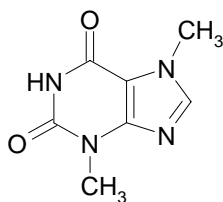


Putrescin

Purinalkaloid



Theophyllin:
R₁=H, R₃=R₄=CH₃
Xanthosin:
R₂=C₅O₄H₉, R₃=R₄=H



Theobromin

D. 6 Untersuchungen zur Induktion der ANMT in Zellkulturen

Gereinigte rekombinante ANMT (C. 3.7) diente der Immunisierung von zwei Kaninchen durch die Firma Nanotools (Tening, Deutschland).

Um die Sensitivität der gewonnenen Seren zu überprüfen wurden in Dot-Blot Untersuchungen abnehmende ANMT-Menge auf PVDF-Membran aufgetragen und mit verschiedenen Verdünnungen der Seren inkubiert (Abb. 35). Die Präimmunseren (PIS) zeigten nur eine schwache Bindung an das Enzym (Abb. 35). Beide Antiseren (AS) zeigten in Verdünnungen von 1:2000 noch deutliche Reaktionen bis zu 8 pg ANMT. Für alle weiteren Untersuchungen wurde das Serum 2 in der Verdünnung von 1:2000 verwendet.

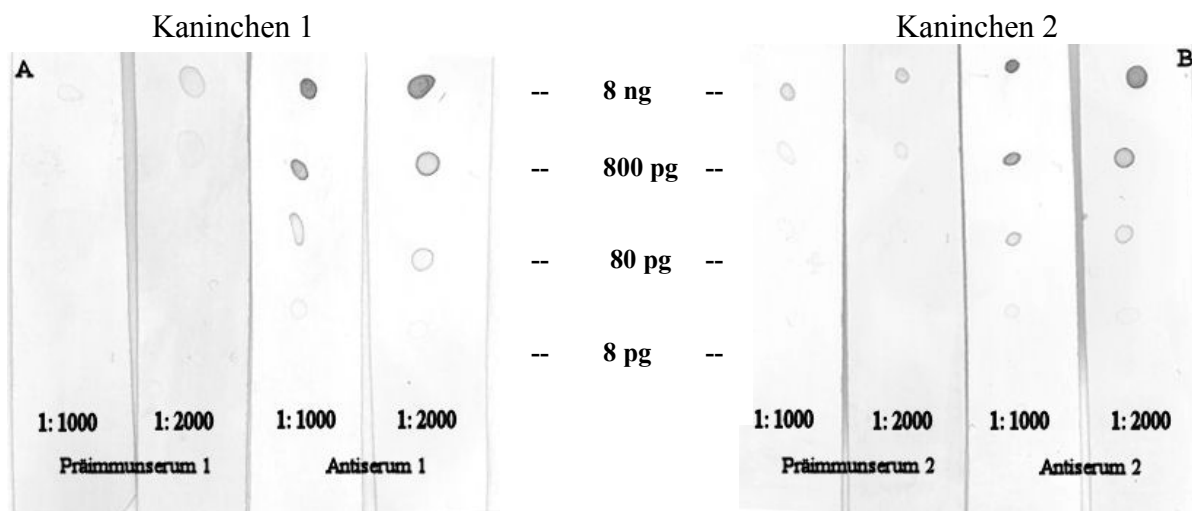


Abb. 35: Dot-Blot Untersuchungen zur Abschätzung der Antikörperabsorption der Kaninchen-Anti-ANMT-Seren

Teil A: Serumfraktion von Kaninchen 1 mit Präimmun- und Antiserum in Verdünnungsstufen von 1:1000 und 1:2000 zur Detektion verschiedener Proteinmengen; Teil B: Serumfraktion von Kaninchen 2 mit Präimmun- und Antiserum in Verdünnungsstufen von 1:1000 und 1:2000 zur Detektion verschiedener Proteinmengen

Mit Rohextrakten aus *Ruta graveolens*-Zellen zeigten die ungereinigten Antiseren nach SDS-PAGE Auftrennung geringe Reaktionen mit anderen Proteinen. Deshalb wurde ein Aliquot des Antiserums von Kaninchen 2 einer Blot-Reinigung (C. 3.13.2) unterzogen. Die so gewonnene Antikörperfraktion reagierte spezifisch nur mit einer 40 kDa Bande und wurde für die anschließenden Untersuchungen verwendet.

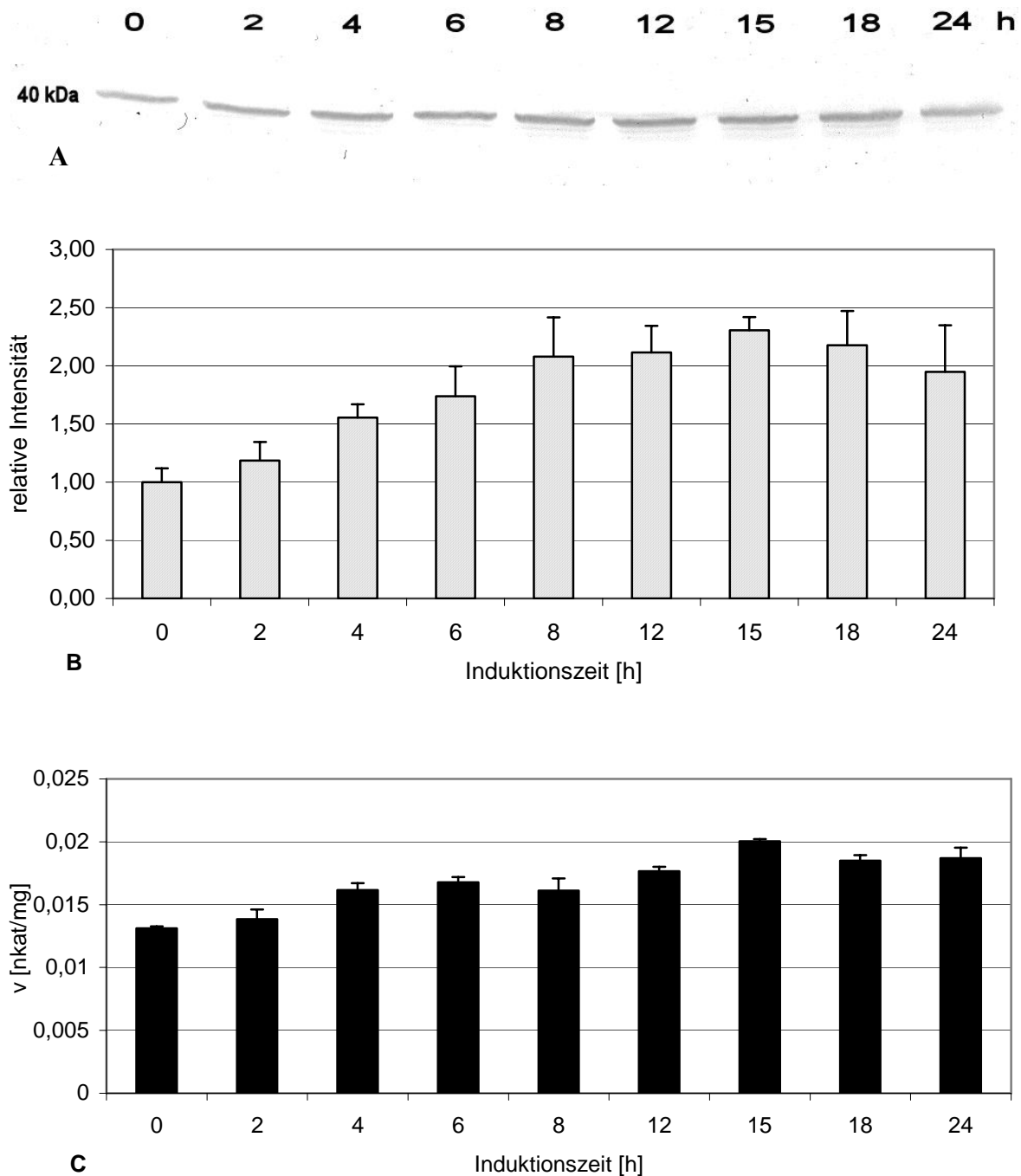


Abb. 36: Analyse der Induktion von ANMT Proteinmenge und Aktivität in R-20 Zellsuspensionskulturen

Teil A: Western Blot zur Untersuchung der Induktion von *Ruta graveolens* (R-20) Zellsuspensionskultur über einen Zeitraum von 0 bis 24 h durch Zugabe von 1 % (w/v) Hefeextrakt. Die Zuordnung der Molekularmasse (kDa) ist am linken Rand des Western Blots gekennzeichnet. Jede Spur enthielt eine Gesamtproteinmenge von 10 µg. Nach dem Blotten der Probe auf PVDF-Membran erfolgte die Proteindetektion durch gekoppelte alkalische Phosphatase unter Zugabe von BCIP und NBT.

Teil B: Graphische Darstellung densitometrischer Messungen von Western Blots zur Untersuchung der Induzierbarkeit der RgANMT in *Ruta graveolens* Zellkulturen. Es wurde der Mittelwert von drei unabhängig voneinander durchgeführten Western Blots verwendet. Als Ausgangswert wurde der Zeitpunkt bei 0 h Induktion verwendet und wegen der konstitutiven Enzymexpression gleich eins gesetzt. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken im Diagramm gekennzeichnet.

Teil C: Graphische Darstellung der spezifischen Enzymaktivität der RgANMT zur Untersuchung der Induzierbarkeit der RgANMT in *Ruta graveolens* Zellkulturen. Es wurde der Mittelwert von drei unabhängig voneinander durchgeführten Testreihen verwendet. Für die Enzymtests wurde für jeden Induktionszeitpunkt eine Menge von jeweils 10 µg Gesamtprotein eingesetzt. Die Standardabweichung wird als Fehlerbalken im Diagramm angezeigt.

Extrakte der Zellen zeigten zu jedem Zeitpunkt der Induktion nur eine Bande von 40 kDa, die mit dem Antiserum reagierte (Abb. 36; Teil A). Nur vereinzelt waren noch schwache Banden von kleinerer Masse erkennbar, die evtl. Abbauprodukte darstellen. Die ANMT war in *Ruta*-Zellen bereits ohne eine Induktion vorhanden, die Menge stieg aber nach 4 h Induktion deutlich zu einem breiten transienten Maximum von 11 h bis etwa 18 h an (Abb. 36; Teil A). Durch die computergestützte Auswertung der Densiometrie (Programm Aida) konnte ein Induktionsfaktor von etwa 2,3 ermittelt werden, der damit sehr gering ausfiel (Abb. 36; Teil B). Das stärkste Signal zeigte sich nach 15 h Induktion. Parallel wurde die ANMT-Aktivitäten der jeweiligen Extrakte gemessen (Abb. 36; Teil C). Auch die Aktivität stieg transient mit einem Maximum nach 15 h an, allerdings nur um einen Faktor von etwa 1,5.

D. 7 Gewebespezifische Expression der ANMT

Aus verschiedenen Geweben (Blätter, Blüten, Stängel und Wurzeln) einer zweijährigen *Ruta graveolens* Pflanze wurde Gesamt-RNA isoliert und nach reverser Transkription (5 µg je Gewebe) eine End-to-End PCR mit variierender Zyklenanzahl (15, 25 und 35) unter Verwendung genspezifischer Primer (MetExpFor und MetExpRev; Tab. 3) durchgeführt (Abb. 37, Teil A). Zur Kontrolle der RNA-Menge wurde die ribosomale 18S rRNA ebenfalls unter Verwendung spezifischer Primer amplifiziert (Abb. 37, Teil B).

Diese semiquantitative Form der PCR zeigte die Expression der ANMT in allen untersuchten Geweben durch ein Amplicon von etwa 1100 bp, das der Länge des offenen Leserahmens der RgANMT von 1095 bp entspricht. Die Amplifikation erforderte mindestens 15 Zyklen und lieferte das stärkste Signal in Blüten und Wurzeln. Die Kontroll-Amplifizierung der 18S rRNA zeigte für alle Gewebe ein ähnliches Ergebnis (Abb. 37, Teil B) mit einem Amplicon von etwa 300 bp, was auf einen Einsatz vergleichbarer RNA-Mengen bei der RT-PCR für jedes Gewebes schließen lässt.

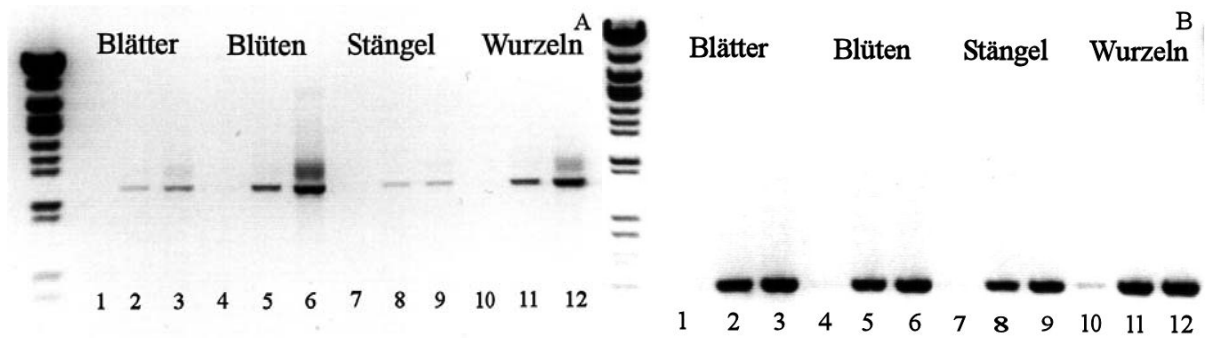


Abb. 37: RT-PCR-Amplifizierung aus verschiedenen Geweben einer zweijährigen *Ruta graveolens* Pflanze

Die PCR erfolgte unter Verwendung spezifischer End-to-End-RgANMT-Primer nach einer Reversen Transkription von 5 µg Gesamt-RNA unterschiedlicher Pflanzengewebe (Blätter, Blüten, Stängel und Wurzeln) einer zweijährigen *Ruta graveolens* Pflanze. Die PCR-Bedingungen waren dabei wie folgt: primäre Denaturierung bei 95 °C für 5 min und anschließend verschiedene Zyklenzahlen (15, 25 und 35) mit Denaturierung bei 95 °C für 30 sec, Annealing bei 53 °C (RgANMT-Primer) bzw. 60 °C (18S rRNA-Primer) für 1 min und Elongation bei 72 °C für 2 Min; Zyklusanzahl: 15 (Spur 1, 4, 7 und 10), 25 (Spur 2, 5, 8 und 11) und 35 (Spur 3, 6, 9 und 12). Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels 1,5 % Agarosegelelektrophorese. Als Größenstandard diente der λ-Marker von MBI Fermentas (St. Leon Roth).

Teil A: RT-PCR mit spezifischen RgANMT Primern (MetExpFor und MetExpRev; Tab. 3);

Teil B: RT-PCR mit spezifischen 18S rRNA Primern (18S rRNAfor und 18S rRNArev; Tab. 3)

E. Diskussion

Die SAM:Anthranilat *N*-Methyltransferase (ANMT) besetzt eine Schlüsselposition im Acridonstoffwechsel an der Schnittstelle zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel (Gröger, 1988). Deshalb wurde bereits mehrmals der Versuch unternommen, die ANMT aus *Ruta graveolens* für eine exakte Charakterisierung zu reinigen (Maier *et al.*, 1995; Burga, 2005). Diese Versuche endeten erfolglos, jedoch kann die Klonierung des ANMT-Gens wesentliche Erkenntnisse liefern. Deshalb wurde mit dieser Arbeit ein erneuter Versuch unternommen.

E. 1 Reinigung der ANMT

Prinzipiell ist eine Klonierung pflanzlicher Gene durch geeignete Wahl von degenerierten Oligonukleotid-Primern möglich. Dieser Weg der Isolation von cDNA-Sequenzen wurde z.B. erfolgreich für verschiedene Cytochrom P450 Enzyme durchgeführt (Holton und Lester, 1996). Voraussetzung ist die Kenntnis von Partialsequenzen oder die nahe Verwandtschaft mit bekannten Enzymen, deren Sequenzen genutzt werden können. Im Fall der ANMT waren keine Sequenzinformationen vorhanden und der Einsatz von degenerierten Primern, die für die Isolierung von OMT-Genen verwendet wurden, führten bei der ANMT nicht zum Erfolg (Burga, 2005). Die Kenntnisse von Sequenzen für NMTn waren sehr begrenzt und diese Enzyme scheinen in ihrer Struktur auch sehr heterolog zu sein. Eine Klonierung mittels degenerierter OMT-Primer ist daher wahrscheinlich nicht möglich.

Vor diesem Hintergrund wurde entschieden, die RgANMT traditionell zu reinigen. Dieser Weg ist auch für andere MTn, wie die β -Alanin-NMT aus *Limonium latifolium* (Raman und Rathinasabapathie, 2003), die Coclaurin-NMT aus *Coptis japonica* (Choi *et al.*, 2002) oder die Phloroglucinol-OMT aus *Rosa chinensis* (Wu *et al.*, 2003) gewählt worden. Die Enzymreinigung der ANMT aus *Ruta graveolens* konnte auf die Methode von Burga (2005) aufbauen und, anders als im Falle der Koffein-NMTn (Ashihara und Crozier, 2001; Waldhauser *et al.*, 1997; Rakwal *et al.*, 2000), die hohe Stabilität der ANMT nutzen.

Im Hinblick auf die Reinigung war in dieser Hinsicht der hohe Verlust an ANMT-Enzymaktivität durch die Ammoniumsulfat-Fraktionierung eine Überraschung, aber der Schritt war entscheidend für die Anreicherung und konzentrierte das Enzym gleichzeitig in einem kleinen Volumen für den nächsten Chromatographieschritt (Tab. 5). Ebenso unersetzlich war die abschließende Affinitätschromatographie an Adenosin-Agarose, die in der Kontrolle durch SDS-PAGE zu einer Hauptbande von ca. 40 kDa führte (Abb. 13). Diese

Chromatographie wurde in der Literatur verschiedentlich zur Reinigung von MTn beschrieben (Chen und Wood, 2004; Kato *et al.*, 1999).

Der errechnete Reinigungsfaktor von 45 für die RgANMT (Tab. 5) erscheint sehr gering in Anbetracht der Anreicherung des Enzyms in 9 ppm des Ausgangsproteins, was auf starke Aktivitätsverluste hinweist. Allerdings wurde die Aktivität mit Radio-Tests ([Methyl-¹⁴C]-SAM) gemessen ohne das zur Elution zugesetzte SAM (bzw. gebildetes SAH) zuvor zu entfernen. Der Grund war die Instabilität des hoch gereinigten Enzyms, das bei Umpuffern oder Einfrieren fast die gesamte Aktivität einbüßte. Insofern ist der in Tab. 5 zuletzt genannte Reinigungsfaktor nur ein fiktiver Faktor.

Der entscheidende Aspekt der Reinigung war aber, dass die zur Kontrolle durchgeführte SDS-PAGE nur noch eine Hauptbande zeigte (Abb. 13) und nach der Reinigung genügend Protein vorhanden war, um eine problemlose Peptidsequenzierung zu erlauben.

Die Korrelation des 40 kDa Proteins mit der ANMT-Aktivität entspricht nicht den Ergebnissen von Maier *et al.* (1995), die ein M_r von 62 kDa mit der SDS-PAGE und von 70 kDa durch Gelfiltration bestimmt hatten. Viele SAM-abhängige pflanzliche Methyltransferasen besitzen eine Größe im Bereich von 23 bis 43 kDa bei SDS-PAGE (Ibrahim und Muzac, 2000). Ausnahmen sind jedoch bekannt, z.B. SMTn mit einem molekularen Gewicht von 115 kDa nach SDS-PAGE und 450 kDa durch Gelfiltration, was auf ein Tetramer schließen lässt (James *et al.*, 1995; Pimenta *et al.*, 1998). Das Reinigungsschema von Maier *et al.* (1995) unterscheidet sich deutlich von dem Protokoll der hiesigen Arbeit, was möglicherweise zu Abweichungen geführt hat. Ein solcher methodischer Effekt wurde von Preisig *et al.* (1989) für die 6a-Hydroxymaackiain 3-OMT aus *Pisum sativum* berichtet, wo zwei Banden von 43 und 66 kDa mit der Enzymaktivität korreliert wurden. Für die 66 kDa Bande wurde unzureichendes Erhitzen in DTT und SDS und damit undenaturiertes Enzym vermutet. Als gesuchtes Enzym konnten Preisig *et al.* (1989) die 43 kDa Bande identifizieren.

Die Reinigung der ANMT lieferte eine starke Bande von 40 kDa und eine schwache Bande bei ca. 60 kDa. Die 40 kDa Bande, unter der sich möglicherweise noch Isoenzym-Polypeptide verstecken, wurde partiell sequenziert. Mit Rücksicht auf die Ergebnisse von Maier *et al.* (1995) wurde auch die 60 kDa Bande ausgeschnitten und partiell sequenziert, lieferte aber keine brauchbaren Erkenntnisse.

E. 2 Partialsequenzen des ANMT-Polypeptids

Die partielle Mikrosequenzierung der 40 kDa Bande lieferte 15 Fragmente mit Ähnlichkeiten zu MTn (Tab. 6). Einige analoge Fragmente waren bereits von Burga (2005) beschrieben, konnten aber nicht zugeordnet werden.

Die Qualität der Proteinsequenzierung zeigte sich in der Zahl von Fragmenten mit Ähnlichkeit zu OMTn bzw. Ähnlichkeit einiger Fragmente untereinander. Dies könnte darauf hindeuten, dass von der RgANMT evtl. Isoenzyme gebildet werden, die sich in geringem Maße in ihrer Sequenz voneinander unterscheiden. Isoenzyme von MTn sind beschrieben, z.B. im Falle der Tetrahydrobenzylisoquinolin-NMT aus *Berberis koetianeana* Zellkulturen (Frenzel und Zenk, 1990). Allerdings sind primäre Sequenzen dieser Enzyme nicht bekannt. Die Ähnlichkeit zu OMTn bedingt allerdings den Nachweis, dass es sich hier wirklich um Fragmente der ANMT aus *Ruta graveolens* handelt, was sich durch Klonierung des Gens und funktionelle Expression klären lässt. Häufig werden Gene nur über die primäre Sequenz klassifiziert (Lee *et al.*, 1997), jedoch ist der Nachweis der enzymatischen Funktion unabdingbar.

E. 3 Klonierung der RgANMT aus Zellsuspensionskulturen

Anders als im Fall von Homologie-Klonierungen konnten nun ANMT-spezifische, degenerierte Primer aus den mikrosequenzierten Peptidfragmenten abgeleitet werden, ein Verfahren, das bereits für andere MTn erfolgreich war (Ounaroony *et al.*, 2003; Raman und Rathinasabapathi, 2003; Wu *et al.*, 2003). Wenn die Klonierung damit nicht gelingen sollte, könnten die degenerierten Oligonukleotide als Sonde mit einer cDNA-Bank eingesetzt werden, wie z.B. für eine OMT aus *Mesembryanthemum crystallinum* beschrieben (Ibdah *et al.*, 2003).

Die Auswahl zur Synthese von Oligonukleotid-Primern für die PCR-Amplifizierung orientierte sich an zwei Gesichtspunkten: Einerseits sollte der Grad der Degenerierung (abhängig von Aminosäurezusammensetzung der Fragmente) nicht zu hoch sein und andererseits sollten die „forward“ und „reverse“ Primer möglichst weit in der Sequenz auseinander liegen. Der letzte Punkt konnte nur im Vergleich mit bekannten OMTn abgeschätzt werden. Tatsächlich wurde auf der Basis von Fragmenten 1 (forward) und 11 (reverse) (Tab. 6) ein 239 bp Amplicon erhalten, das über RACE zur vollständigen cDNA (Abb. 17) verlängert werden konnte. Das translatierte Polypeptid von 40 kDa enthielt die

meisten der zuvor durch Mikrosequenzierung ermittelten Partialpeptide (Tab. 6) mit kleinen Änderungen. So können Leucin und Isoleucin durch Massenspektrometrie nicht unterschieden werden (Tab. 6; Burga, 2005) und Methioninreste oxidieren, die dann wegen gleicher Masse als Phenylalanin gelesen werden (persönliche Mitteilung Dr. P. Hunziker, Universität Zürich). Die Fragmente Nr. 4 und 6 (Tab. 6) wurden nicht in der RgANMT Sequenz gefunden. Es kann sich um Bruchstücke eines Proteins mit ähnlichem Gewicht oder eine weitere MT (evtl. Isoenzyme der ANMT) handeln, da beide Peptide eine gewisse Ähnlichkeit zu bekannten MTn aufweisen (persönliche Mitteilung Dr. P. Hunziker, Universität Zürich). Peptid 4 zeigte Ähnlichkeit zur Protein-L-Isoaspartat-OMT aus *Streptomyces coelicolor* (NP 630995). Für Peptid 6 konnten Ähnlichkeit zu Kaffeat-OMTn aus einer *Saccharum officinarum* (AJ231133, unveröffentlicht) und *Sorghum bicolor* (AF387790, unveröffentlicht) gefunden werden. Überraschend war zunächst die starke Ähnlichkeit des klonierten Gens mit bekannten OMT-Genen, insbesondere weil zuvor eine Homologie-Klonierung mit degenerierten Kaffeat-OMT-Primern (Frick und Kutchan, 1999) nur zu einer anderen OMT geführt hatten (Burga *et al.*, 2005). Die dafür verwendeten degenerierten Primer der Arbeit von Frick und Kutchan (1999) basieren auf einer Arbeit von Dumas *et al.* (1992) und beinhalten Teilbereiche einer Kaffeat-OMT aus der Pappel (M73431). Die entsprechenden Aminosäurebereiche (Peptid A: VDVGGGTGA und Peptid B: PHVIEDAP) sind auch in ähnlicher Form in der Sequenz der RgANMT vorhanden, allerdings ist vor allem die Ähnlichkeit von Peptid B zur RgANMT nur sehr gering.

Die entsprechenden Primer der Peptide A, B und C der Arbeiten von Frick und Kutchan (1999) sowie Dumas *et al.* (1992) sind in Tab. 10 in Sensesrichtung im Vergleich zur RgANMT angegeben.

Tab. 10: Nukleotidvergleich der Primer nach Frick und Kutchan (1999) zu RgANMT-Teilsequenzen

Bezeichnung	Sequenz (5'---3')
Peptid A	GTIGA(CT)GTIGGIGGGIACIGGIGC
RgANMT	GTCGACGTCGGCGGAGGCCTCGGTGT
Peptid B	CCICA(CT)GTIATIGA(AG)GA(CT)GCICCC
RgANMT	CCTCATGTTGTTCAAGATGCCGCT
Peptid C	GTCACI AGCAGIGIGGTCAGCAC

Zu Peptid C konnte kein analoger Sequenzbereich innerhalb der RgANMT gefunden werden. Zwischen den Peptiden A und B und der eigentlichen RgANMT gibt es einige Unterschiede. Vor allem der Bereich des 3'-Endes beider Primer, der wichtig für eine gute Bindung der Primer an die cDNA ist, zeigt zur eigentlichen Basensequenz der RgANMT deutliche

Differenzen. Die Vermutung liegt somit nahe, dass diese Unterschiede ein Annealing an die *RgANMT*-Sequenz verhinderten. Hehmann (2004) konnte im Vergleich dazu mit den oben angegeben Primern aus *Ammi majus* Zellkulturen mehrere OMTn isoliert, worunter sich auch die Kaffeat-OMT befand. Für *Ruta graveolens* war dies so bisher nicht möglich (Burga, 2005).

Ein Vergleich der degenerierten Primer, die für die Amplifizierung der ANMT-cDNA verwendet wurden, mit der vollständigen *RgANMT*-Sequenz (Abb. 17; Abb. 18) zeigt, dass beide Primer nur geringe Unterschiede der Basensequenz (bis auf degenerierte Basen) aufweisen und in hoch konservierten Bereichen liegen.

Tab. 11: Vergleich der Sequenzen der degenerierten Primer mit *RgANMT*-Teilbereichen.

Primer	Sequenz
Metdg_gb1h ANMT- Sequenz	5'-GC(ACGT)CC(ACGT)GT(ACGT)ATG(CT)T(ACGT)GA(CT)(AC)G-3' 5'-GCACCGGTGATGCTGGATCG-3'
Metdg_gb2 ANMT- Sequenz	5'-TT(AG)AA(ACGT)GG(ACGT)A(AG)(ACGT)CC(ACGT)CC(CT)TC(AG)AA(ACGT)AC-3' 5'-TTGAATGGTATCCCTCCCTCCATCAC-3'

Während das Peptidfragment 1 (Tab. 6) vollständig homolog zu anderen MTn (Abb. 18) ist, besitzt Peptidfragment 11 dagegen weitaus geringere Ähnlichkeit und der abgeleitete Primer somit höhere Spezifität für die *RgANMT*-DNA. Von Vorteil war sicherlich auch, dass beide Primer im weniger konservierten N-terminal kodierenden Bereich lokalisiert waren und nicht in der Region der hoch konservierten SAM-Bindungsstellen. Die Klonierung der für die ANMT kodierenden DNA wurde sicherlich auch durch die Tatsache erleichtert, dass die ANMT durch Elizitierung induziert werden kann. Allerdings exprimieren *Ruta*-Zellen das Enzym bereits konstitutiv, die transiente Steigerung der Aktivität durch Elizitierung ist relativ gering (Abb. 36) und die Elizitierung induziert auch eine Reihe anderer Prozesse.

Es ist nicht eindeutig erklärbar, warum die Isolation der *RgANMT*-cDNA mit dieser Kombination von degenerierten Primern erfolgreich war.

E. 4 Funktionelle Expression der ANMT in *E. coli*

Anhand der funktionellen Überprüfung des rekombinanten ANMT-Enzyms wurde eine Aktivität mit Anthranilat als Substrat festgestellt.

Eine Expression mit daran anschließender funktioneller Überprüfung ist überaus wichtig. Eine Aussage über das verwendete Substrat basierend auf der Aminosäuresequenz des Proteins zu machen von Schröder und Mitarbeitern (2002) versucht, gibt oft die Einordnung von Enzymen in eine falsche Gruppe (Li *et al.*, 2006; Larsson *et al.*, 2006). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der RgANMT zu Catechol- oder Kaffeat-OMTn würde eine Klassifizierung der ANMT als Kaffeat-OMT auch hier am wahrscheinlichsten sein. Für eine erste funktionelle Überprüfung wären daher diese beiden Substrate in Betracht gekommen. Enzymtests mit dem rekombinanten Enzym zeigen für diese aber keine Aktivität. Hätte von Beginn an nicht das Wissen bestanden, dass es sich bei dem gesuchten Enzym höchstwahrscheinlich um eine NMT handelt, wären stickstoffhaltige Substrate und Substrate von bisher charakterisierten NMTn nicht mit in die Untersuchungen einbezogen worden. Auch eine NMT aus *Hordeum vulgare* ist ein repräsentatives Beispiel dafür, die Substratspezifität nicht anhand der primären Sequenz vorherzusagen (Larsson *et al.*, 2006). Das Enzym wurde zunächst aufgrund von Sequenzvergleichen als putative Kaffeat-OMT eingeordnet (Lee *et al.*, 1997). Nach einer funktionellen Überprüfung stellte sich jedoch heraus, dass es sich um eine NMT handelt, die Substrate der Graminbiosynthese methyliert.

Deswegen ist eine funktionelle Überprüfung der cDNA von Enzymen zur eindeutigen Identifizierung unbedingt notwendig. Die Betrachtung der primären Sequenz kann immer nur als erster Anhaltspunkt dienen. Eine funktionelle Überprüfung von bisher als putativ deklarierten MTn aus den Datenbanken mit einem breitem Spektrum an Substraten könnte somit eine Aufklärung über deren tatsächlichen Substratspezifität und auch ihre evtl. Bedeutung/Funktion innerhalb des Metabolismus einer Pflanze bringen.

E. 5 Biochemische Charakterisierung

Das rekombinante Enzym konnte mit Literaturdaten des partiell gereinigten pflanzlichen Enzyms (Maier *et al.*, 1995) und anderen MTn verglichen werden.

Die gemessenen Massen von 40 kDa für das denaturierte Enzym und ca. 80 kDa für das native Enzym weisen auf ein Homodimer hin, in Übereinstimmung mit anderen pflanzlichen MTn, deren Untereinheiten von 23-43 kDa variieren. Damit kann die *Ruta*-ANMT der Klasse II der pflanzlichen MTn zugeordnet werden, die ein M_r von 38-43 kDa besitzen (Ibrahim und Muzac, 2000). Die früher bestimmten Größen für das partiell gereinigte Enzym von 62 kDa (denaturiert) bzw. 70 kDa (nativ) hatten zur Annahme eines Monomers geführt (Maier *et al.*, 1995). Wie bereits schon beschrieben, könnte es sich bei der Arbeit von Maier *et al.* (1995) um ein anderes Enzym handeln, dass korrelierend mit der RgANMT-Enzymaktivität angereichert wurde.

Bereits von Baumert *et al.* (1983) wurde nachgewiesen, dass die pflanzliche RgANMT kein Mg^{2+} für eine optimale Aktivität benötigt. Dies konnte auch für die rekombinante RgANMT gezeigt werden. Dadurch wird die Zugehörigkeit des Enzyms zur Mg^{2+} -unabhängigen Gruppe II pflanzlicher MTn bestätigt (Ibrahim und Muzac, 2000).

Bei Messungen des pH-Wertes zeigte sich eine Diskrepanz zwischen rekombinantem und pflanzlichem Enzym. Die rekombinante ANMT weist die höchste Umsatzrate in Natriumglycinatpuffer bei einem pH von 7,5 auf. Untersuchungen der optimalen Enzymaktivität des nativen pflanzlichen Enzyms zeigten für den Rohextrakt jedoch einen pH-Wert von 8,2 (Baumert *et al.*, 1983) und für das gereinigte pflanzliche Enzym von 7,8 (Maier *et al.*, 1995) jeweils gemessen in Tris-HCl-Puffer. In Tris-HCl zeigte sich für die rekombinante RgANMT ein optimaler pH-Wert bei 7,0. Die Vermutung, der angehängte His-Tag könne für die Verschiebung des pH-Optimums verantwortlich sein, konnte nach Tests mit einer rekombinanten ungetaggten RgANMT nicht bestätigt werden (Rohde *et al.*, 2008). Bisher konnte dieser Sachverhalt nicht geklärt werden. Aufgrund der optimalen Aktivität der rekombinanten RgANMT in neutralem bis leicht basischem Bereich könnte eine Lokalisation im Cytosol vermutet werden, welches ein ähnliches Milieu bietet. Dieser Sachverhalt wurde auch bereits von Maier *et al.* (1995) für das pflanzliche Enzym postuliert. Eine solche Vermutung liegt auch nahe, da keinerlei plastidäre Erkennungssequenzen innerhalb der RgANMT-Sequenz gefunden wurden. Viele MTn arbeiten am effizientesten bei einem neutralen bis leicht saurem pH-Wert, so z.B. auch die rekombinante (Iso)Eugenol-OMT aus

Clarkia breweri (Wang und Pichersky, 1998) oder die Cocclaurin-NMT aus *Coptis japonica* (Choi *et al.*, 2002).

Das Temperaturoptimum der ANMT-Aktivität von 37 ° C ist nicht ungewöhnlich für MTn (Ibdah *et al.*, 2003). Es könnte mit einer beginnenden Proteindenaturierung zusammenhängen oder aber auch darin begründet liegen, dass die Pflanze ursprünglich im Mittelmeerraum beheimatet ist (Becela-Deller, 1995).

Auffällig ist die Hemmung durch Fe^{2+} , Fe^{3+} und Cu^{2+} und insbesondere für Zn^{2+} (je 1,5 mM). Diese Beobachtungen konnten auch für das pflanzliche Enzym gemacht werden (Maier *et al.*, 1995). Auch für andere MTn kann speziell durch Metallionen eine spezifische Hemmung nachgewiesen werden (Wang und Pichersky, 1998). Dafür verantwortlich können konformelle Veränderungen oder eine Blockierung des aktiven Zentrums durch diese Ionen sein (Zhao *et al.*, 2007).

Sowohl das pflanzliche als auch das rekombinante Enzym zeigen eine bemerkenswerte Stabilität (Baumert *et al.*, 1983; Abb. 31; Abb. 32). Der totale Verlust der Aktivität des pflanzlichen Enzyms nach Affinitätschromatographie war daher überraschend, lässt sich aber evtl. durch das mehrmalige Einfrieren während der Reinigung erklären. Dies wird auch durch die Stabilitätstests, die für das rekombinante Enzym durchgeführt wurden, deutlich (Tab. 8). Vermutlich kommt es beim Einfrieren zu einer teilweisen irreversiblen Denaturierung von Protein.

Mit der rekombinanten ANMT wurden K_m -Werte von 7,1 μM für Anthranilat und 3,3 μM für SAM, sowie 3,1 μM (Anthranilat) und 37,9 μM (SAM) von Maier *et al.* (1995) für das partiell aus *Ruta*-Zellen gereinigte Enzym gemessen. Der früher bestimmte relativ hohe Wert für SAM kann mit der Qualität der Substanz zusammenhängen. Die hohe Affinität von Substrat und Cosubstrat zur ANMT wird deutlich im Vergleich zu anderen MTn, wie der rekombinanten Koffeinsynthase aus *Camellia sinensis* mit 24 μM (Paraxanthin) und 21 μM (SAM) (Kato *et al.*, 1999), der NMT aus *Hordeum vulgare* mit K_m -Werten von 77 μM , 184 μM und 148 μM für 3-Aminomethylindol, *N*-Aminomethylindol und SAM (Larsson *et al.*, 2006) oder die Cocclaurin-NMT aus *Coptis japonica* mit 160 μM (Norreticulin) und 390 μM (SAM) (Choi *et al.*, 2001), die weitaus höhere K_m -Werte als die rekombinante RgANMT aufweisen. K_m -Werte in etwa vergleichbarer Dimension liefert die Tetrahydroprotoberberin cis-NMT aus *Papaver somniferum* mit 0,6 μM für Stylopin und 11,5 μM für SAM (Liscombe und Facchini, 2007).

Während der K_m -Wertmessungen konnte eine Aktivitätshemmung der ANMT durch hohe SAM-Konzentrationen beobachtet werden (Abb. 34), was auch bereits für das pflanzliche

Enzym beschrieben wurde. Für die pflanzliche ANMT konnte nachgewiesen werden, dass dafür eigentlich die zunehmende Menge an SAH verantwortlich ist (Maier *et al.*, 1995). Dieses Phänomen einer Aktivitätshemmung durch SAH wurde bereits für viele andere pflanzliche MTn berichtet (Sato *et al.*, 1994, Kranz und Petersen, 2003; Kato *et al.*, 1999). SAH stellt dabei einen kompetitiven Inhibitor dar, der das aktive Zentrum des Enzyms blockiert (Moffatt und Weretilnyk, 2001). Auch für die rekombinante RgANMT ist wahrscheinlich die Hemmung durch das Endprodukt SAH gegeben. Eventuell dient das intrazelluläre Verhältnis von SAM zu SAH der Regulation der Enzymaktivität *in vivo*, wie es auch für die Koffeinsynthese aus *Camellia sinensis* vermutet wird (Ashihara und Croizer, 2001; Kato *et al.*, 1999).

E. 6 Substratspezifität

Die rekombinante RgANMT zeigte hohe Substratspezifität für Anthranilat und lieferte nur *N*-Methylantranilat als Endprodukt. Solch hohe Spezifitäten sind typisch für viele Enzyme, die am Beginn eines Biosyntheseweges aktiv sind (Schwab, 2003). So auch für die RgANMT, die als Schlüsselenzym am Beginn des Acridonbiosyntheseweges steht.

Weder Salicylat noch Stellungsisomere des Anthranilats (3- oder 4-Aminobenzoat) oder Zimtsäuren etc. wurden akzeptiert (Tab. 9). Dies ist bemerkenswert, weil sowohl für OMTn aber auch NMTn verschiedentlich breite Substratspezifitäten beschrieben wurden (Ibrahim und Muzac, 2000; Liscombe und Facchini, 2007). Dies ist auch im Sachverhalt der höchsten Sequenzidentität der ANMT mit Catechol- und Kaffeat-OMTn zusehen, für die ebenfalls ein weites Substratspektrum gezeigt wurde (Pellegrini *et al.*, 1993; Dixon *et al.*, 2001). Die phylogenetischen Untersuchungen und die Sequenzvergleiche scheinen eine Verwandtschaft der RgANMT zu den Kaffeat-OMTn nahezulegen. Andererseits grenzt die Sequenzähnlichkeit die ANMT von NMTn aus der Koffeinbiosynthese ab, was auch durch fehlende Methylierung von Purinalkaloiden (Tab. 9) bestätigt wurde.

Die freie Carboxylgruppe von Anthranilat scheint wichtig zu sein, weil weder Anthranilsäuremethylester noch Anthraniloyl-CoA umgesetzt wurden.

Anthranilat ist ein relativ kleines Molekül, das wahrscheinlich leicht Zugang zum aktiven Zentrum der RgANMT findet, was eine entscheidende Rolle spielen kann (Zubieta *et al.*, 2002). Die Kristallstruktur der Kaffeat-OMT aus *Medicago sativa* zeigt ein aktives Zentrum, das weitaus größer ist als in der ebenfalls kristallisierten ChOMT und IOMT aus *Medicago sativa* (Zubieta *et al.*, 2002). Die räumlichen Gegebenheiten im aktiven Zentrum der ANMT können erst nach Kristallisation gemessen werden. Allerdings bieten die Strukturen von

bisher kristallisierten pflanzlichen MTn die Möglichkeit Homologiemodelle zu entwickeln (Gang *et al.*, 2002). Zumindest lassen sich durch Alignments solche Aminosäuren identifizieren, die für die Bindung wichtig sind (Zubieta *et al.*, 2001). Bereiche für die Bindung des Co-Substrates SAM sind hoch konserviert, wohingegen die Elemente für die Substratbindung variieren (Ibrahim *et al.*, 1998).

Eine Betrachtung der nach Zubieta *et al.* (2001) als wichtige katalytische Aminosäuren definierten Reste in der ANMT ist von besonderer Bedeutung (Abb. 38). In der *Medicago sativa* ChOMT scheint His-291 notwendig für die Deprotonierung der Hydroxylgruppe zu sein (Zubieta *et al.*, 2001). Die RgANMT besitzt ein Histidin in äquivalenter Position (Abb. 38). Im Gegensatz dazu sind in der LIßANMT und der HvNMT ein Threonin bzw. Leucin an dieser Position zu finden. Diese beiden Enzyme katalysieren jeweils *N*-Methylierungen und leiten sich vermutlich wie die RgANMT von OMTn ab (Raman und Rathinasabapathi, 2003; Larsson *et al.*, 2006). Trotz unterschiedlicher katalytischer Reste nutzen beide Enzyme vermutlich denselben Mechanismus, was die Bedeutung von His-291 in der *Medicago sativa* ChOMT relativiert. Ebenso wichtig für die Katalyse wurden die Reste Glu-322 und Glu-355 in der ChOMT (Abb. 38) postuliert (Zubieta *et al.*, 2001), die His-291 flankieren und die Orientierung des Substrates für die Deprotonierung erleichtern sollen.

RgANMT besitzt an Position 298 jedoch ein Asparagin. Aminosäure 330 ist auch in der RgANMT ein Glutamat. Um die Bedeutung des Asparagins an Position 298 in der RgANMT zu untersuchen, wurden Mutationsstudien dieser Aminosäure zu einem Glutamat durchgeführt, die die Bedeutung als katalytisch wichtige Aminosäure, verdeutlichen sollten (Rohde *et al.*, 2008; Zubieta *et al.*, 2001). Vermutungen, dass durch die Mutation des Asparagins an Position 298 zum Glutamat eine veränderte Substratspezifität evtl. hin zum Kaffeat zu beobachten wäre, konnten nicht bestätigt werden (Rohde *et al.*, 2008). Jedoch wurde durch den Austausch eine um etwa das 150-fache verringerte katalytische Aktivität des mutierten Enzyms für Anthranilat im Vergleich zum Wildtyp beobachtet (Rohde *et al.*, 2008). Das Postulat von Zubieta *et al.* (2001), das speziell den Aminosäuren His-291, Glu-322 und Glu-355 wichtige katalytische Eigenschaften zuschreibt kann also nicht zutreffen. Dies wird auch durch andere Sequenzen, wie der LIßNMT und der HvNMT bestätigt (Abb. 38). Die katalytische Funktion kann anscheinend auch von anderen Aminosäuren übernommen werden. Eine Mutation des als ebenfalls katalytisch wichtig postulierten Histidins (Zubieta *et al.*, 2001) wäre für eine Überprüfung der Bedeutung in der RgANMT-Sequenz noch sinnvoll.

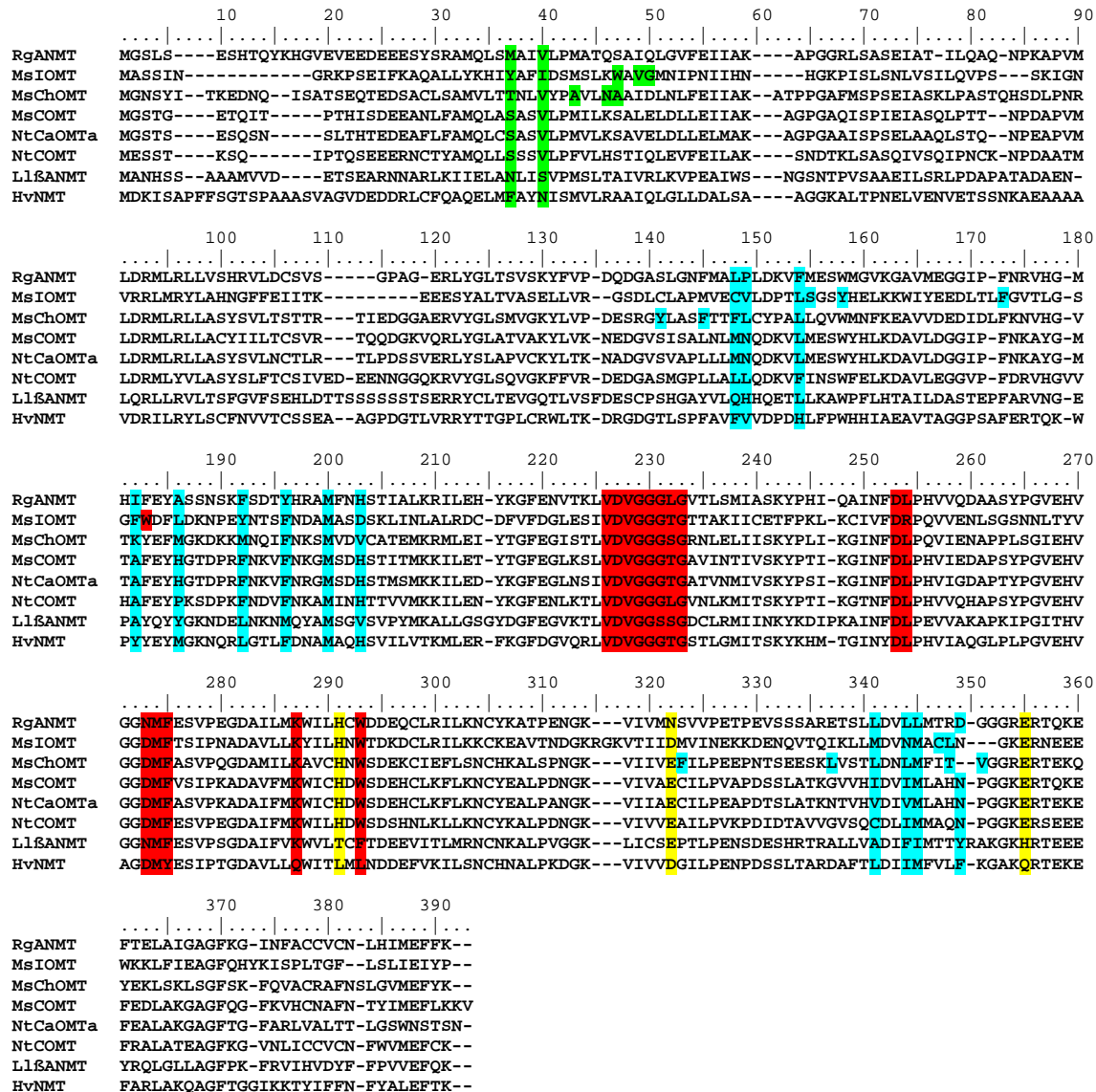


Abb. 38: Zuordnung katalytisch aktiver Sequenzmotive im Alignment

grün: Substratbindung Dimer; gelb: katalytische Reste; rot: SAM-Bindung und blau: Substratbindung; RgANMT (DQ884932), MsIOMT (AAC49927), MsChOMT (AAB48059), MsCOMT (AAB46623), NtCaOMTa (X71430), NtCOMT (AF484252), Li&ANMT (AY216903) und HvNMT (U54767)

E. 6.1 Acridonalkaloidbiosynthese in *Ruta graveolens* L.

Es wurde bereits vermutet, dass die Methylierung von Anthranilat der Aktivierung zum CoA-Ester vorangeht (Gröger, 1988). Allerdings konnte eine Aktivierung von Anthranilat mit nachfolgender Methylierung zum *N*-Methylantraniloyl-CoA bisher nicht ausgeschlossen werden (Abb. 7). So ist die Aktivierung von Anthranilat aus Bakterien bekannt (Altenschmidt *et al.*, 1991; Altenschmidt und Fuchs, 1992). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dokumentieren, dass zumindest in *Ruta graveolens* nur freie Anthranilsäure methyliert wird. Unterstützt wird diese Aussage dadurch, dass sowohl die Wildtyp ACS als auch das

rekombinante Enzym aus *Ruta graveolens* zwar Anthraniloyl-CoA als Substrat akzeptiert, dies jedoch mit einer weitaus schwächeren Substratspezifität als *N*-Methylantraniloyl-CoA im Vergleich dazu (Baumert *et al.*, 1993; Schreiner, 2004). Zu klären bleibt aber in diesem Zusammenhang auf jeden Fall noch die Substratspezifität der entsprechenden CoA Ligase, deren Aktivität zumindest im Rohextrakt gemessen wurde (Baumert *et al.*, 1985).

Die physiologische Bedeutung der *in vitro* Ergebnisse müssen also insgesamt noch abgeklärt werden.

Einige *Ruta*-Arten enthalten Acridonalkaloide ohne Methylierung des Stickstoffs (Skaltsounis *et al.*, 2000), deren Herkunft nur vermutet werden kann. Es ist wahrscheinlich, dass die Acridonalkaloide zu einem späteren Zeitpunkt demethyliert werden (Baumert *et al.*, 1983). Oxidative Demethylierungen verlaufen in mindestens zwei Stufen von Naturstoffen ausgehend über eine Formyl-Zwischenstufe ab. Tatsächlich wurden auch solche Acridonalkaloide in *Taddaliopsis sp.* gefunden (Naidoo *et al.*, 2005). In Tabak konnte eine Demethylierung von Nikotin zu Nornikotin nachgewiesen werden (Siminszky *et al.*, 2005), wobei vermutlich eine Cytochrom P450 Monooxygenase beteiligt ist. Andererseits katalysiert eine Peroxidase aus der Sojabohne eine Demethylierung von Methyl-*N*-Methylantranilat zu Methylantranilat (Van Haandel *et al.*, 2000). Es ist daher zu vermuten, dass für die Demethylierung von Acridonen in *Ruta graveolens* solche Enzyme verantwortlich sind.

Aufgrund der besonderen Stellung im Stoffwechsel besitzt die ANMT biotechnologisch eine große Bedeutung. Eine Hemmung in Rutaceen könnte den Weg zu den Acridonalkaloiden versperren. Andererseits könnte eine Überexpression den Weg zu *L*-Tryptophan treffen bzw. zu entsprechenden Metaboliten. Als Modellpflanze kann auch hier *Arabidopsis thaliana* dienen, die ihre Phytoalexine (Camalexine) aus Indol ableitet (Glawischnig, 2007). Je nach Stärke des Effektes könnte die Überexpression auch letal sein. Die Bedeutung von NMTn konnte kürzlich im Falle des Koffeins demonstriert werden. Entkoffeinierter Kaffee lässt sich aus transgenen Pflanzen gewinnen, in denen durch RNAi die Expression der Purinalkaloid-MTn unterdrückt ist (Ogita *et al.*, 2004).

Ein anderes Beispiel ist die Expression der Tryptophan Feedback resistenten As α -Untereinheit in *Arabidopsis*, in der eigentlich nur die sensitive Form vorhanden ist (Ishihara *et al.*, 2006). Hier zeigte sich ein Anstieg im Tryptophangehalt der transformierten Pflanzen.

E. 7 Phylogenetische Zuordnung

Die schon an Hand der Partialfragmente (Tab. 6) beobachtete Verwandtschaft zu OMTn bestätigte sich in der vollständigen Sequenz (Abb. 17) mit 56 % Identität der ANMT zu einer putativen OMT (Familie II) aus *Medicago truncatula* und zur Catechol-OMT aus *Nicotiana tabacum*. Etwas geringere Ähnlichkeit besteht zu vielen Kaffeat-OMTn und anderen OMTn (Abb. 18; Abb. 39), sowie NMTn aus *Hordeum vulgare* und *Limonium latifolium*, die sich wahrscheinlich ebenfalls aus OMTn entwickelt haben (Larsson *et al.*, 2006). Dagegen liegt kaum Ähnlichkeit zu Koffein-NMTn oder den Carboxyl-MTn vor.

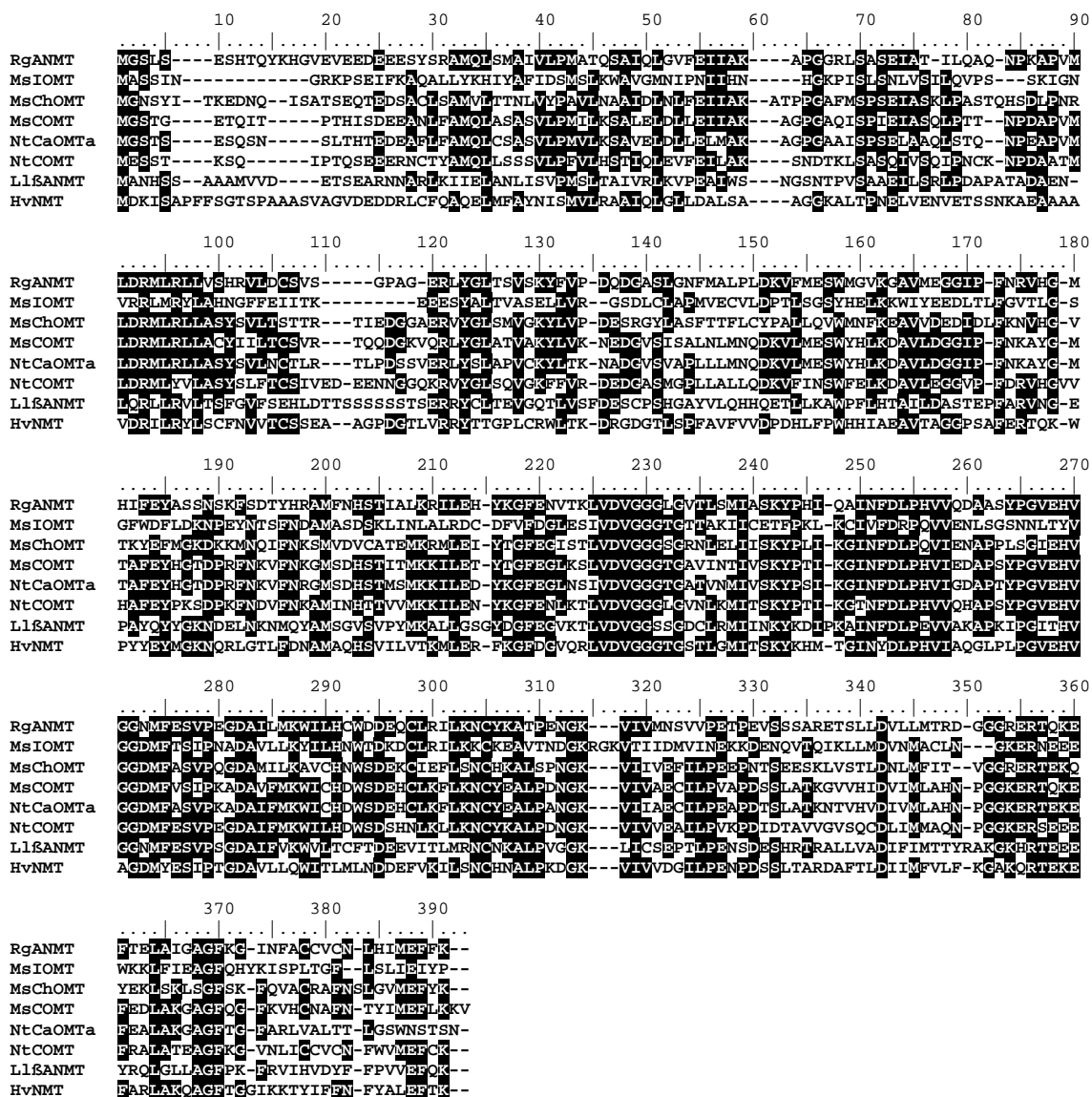


Abb. 39: Sequenzalignement zur Phylogenie der ANMT

[RgANMT (DQ884932), MsIOMT (AAC49927), MsChOMT (AAB48059), MsCOMT (AAB46623), NtCaOMTa (X71430), NtCOMT (AF484252), LiANMT (AY216903) und HvNMT (U54767)]

Die hoch konservierten Bereiche in der Ruta-ANMT und verwandten OMTn liegen hauptsächlich im C-terminalen Abschnitt, wo auch die putativen SAM-Bindungsmotive postuliert werden (Joshi und Chiang, 1998; Abb. 18; Abb. 39). Die Elemente für die Bindung des jeweiligen Substrates unterscheiden sich vermutlich, da sehr verschiedene Verbindungen methyliert werden. Diese Elemente können für die ANMT erst nach Kristallisation des Enzyms benannt werden (Zubieta *et al.*, 2001; Zubieta *et al.*, 2003).

Die Sequenzähnlichkeiten klassifizieren die RgANMT (Abb. 19) als Enzym, das sich wahrscheinlich aus einem Cluster von OMTn entwickelt hat. Dies gilt auch für andere NMTn wie z.B. die β -Alanin NMT aus *Limonium latifolium* (Raman und Rathinasabapathi, 2003). Die Entwicklung von neuen Enzymen aus Kaffeat-OMTn wurde exemplarisch für zwei Trihydroxybenzoe-OMTn aus *Vanilla planifolia* nachgewiesen (Li *et al.*, 2006), obwohl die Sequenzidentität zu Kaffeat-OMTn nur ca. 52 % beträgt. Neben der hohen Identität der Ruta-ANMT mit der Catechol-OMT aus *Nicotiana tabacum* usw. (Abb. 18; Abb. 19) ist auch die mit 52 % relativ hohe Identität zur Kaffeat-OMT aus *Citrus sinensis* x *Citrus reticulata* (EF520737, unveröffentlicht) zu nennen, da es sich um einen Vertreter der Rutaceen handelt. Kaffeat-OMTn müssen wegen ihrer Bedeutung für die Ligninbiosynthese zu einem frühen Zeitpunkt der Evolution entstanden sein (Wang und Pichersky, 1999; Ibrahim und Muzac, 2000). Ein Vergleich der ANMT mit der Ruta-eigenen COMT bietet sich daher an. Diese OMT wurde bisher jedoch noch nicht kloniert. Darüber hinaus könnte die Klonierung weiterer ANMTn aus anderen acridonhaltigen Pflanzenspezies, wie z.B. aus Zitrusarten, Aufschluss über die Evolution geben.

Die Entwicklung einer neuen Substratspezifität kann nur wenige Mutationen erfordern (Pichersky und Gang, 2000), die nach Genverdopplung für die Pflanze ohne Konsequenz sind, solange ein Wildtyp-Gen erhalten bleibt (Schwab, 2003). Für die Pflanze ergibt sich dadurch ein selektiver Vorteil. Dabei bleibt die Tertiär- bzw. Quartärstruktur weitgehend erhalten, ebenso wie die Bereiche für die SAM-Bindung und die Methyltransferaseaktivität. Es ist daher anzunehmen, dass dieser Sachverhalt auch für die ANMT aus *Ruta graveolens* gilt.

E. 8 Expression der RgANMT

Dunkel wachsende *Ruta*-Zellen exprimieren die ANMT konstitutiv (Abb. 36) was mit früheren Aktivitätsmessungen übereinstimmt (Eilert und Wolters, 1989). Dies gilt auch für die Acridonsynthese (Junghanns *et al.*, 1998). Acridonalkaloide zeigen antimykotische Aktivität und ihnen wurde eine Rolle als Phytoalexine zugeschrieben (Gröger, 1988). Dem steht allerdings die konstitutive Expression entgegen, obwohl die Aktivität der relevanten Enzyme unter Elizitierung gesteigert wird (Junghanns *et al.*, 1998). Da die Ergebnisse mit Zellkulturen nicht direkt auf differenzierte Pflanzen übertragbar sind, war die gewebespezifische Expression von Interesse. Sowohl die Acridonsynthese (Junghanns *et al.*, 1998) als auch die ANMT (Abb. 37) werden in allen Pflanzenteilen konstitutiv exprimiert. Acridonalkaloide sind deshalb eher als Phytoanticipine (Junghanns *et al.*, 1998; VanEtten *et al.*, 1994) anzusehen, da sie bereits vor dem Befall mit Phytopathogenen vorliegen. Phytoalexine werden im Gegensatz dazu nachweislich erst durch Befall mit Phytopathogenen gebildet.

Die Behandlung von *Ruta*-Zellkulturen mit Hefeextrakt als Elizitor führt zum kurzfristigen transienten Anstieg der ANMT-Expression wie es schon für die entsprechende Aktivität gezeigt wurde (Eilert und Wolters, 1989). Gleiches gilt für die Acridonsynthese (Junghanns *et al.*, 1998), wobei die maximale Steigerung der Enzymaktivität nur einen Faktor von etwa drei erreicht. Es ist möglich, dass die an der Biosynthese beteiligten Enzyme *in situ* in Komplexen vorliegen, was die Effizienz durch Kanalisierung der Intermediate erhöht (Bohlmann *et al.*, 1996). Die funktionelle Einheit sequentiell arbeitender Enzyme wurde z.B. für die Flavonoidbiosynthese postuliert (Winkel-Shirley, 1999). Dies setzt allerdings voraus, dass die beteiligten Enzyme in einem Kompartiment vorliegen.

Die semiquantitative Messung der ANMT-Transkriptmenge aus den verschiedenen Geweben von *Ruta*-Pflanzen zeigte, dass ANMT in allen Pflanzenteilen – allerdings mit unterschiedlichen Intensitäten – exprimiert wird. Die stärksten Transkriptsignale waren in Wurzeln und Blüten zu finden, geringere, aber deutliche Signale auch in Blättern und Stängeln (Abb. 37). Die Gewebeverteilung deckt sich mit den Ergebnissen zur Acridonsynthese (Junghanns *et al.*, 1998). Die Wurzel hat relativ großen Anteil an der Synthese von Acridonen, aber diese läuft in geringerem Umfang auch in anderen Geweben ab. Erste Tissue Print-Untersuchungen mit spezifischen RgANMT-Antikörpern bestätigen dieses Ergebnis (Rohde *et al.*, 2008).

Mikroskopisch wurde die größte Menge an Acridonen in den Idioblasten der Wurzel gefunden (Eilert *et al.*, 1986), aber auch in Blatt und Blüte sind Acridone nachweisbar. In

Solanaceen werden z.B. Alkaloide in der Wurzel synthetisiert und von dort in die restlichen Pflanzenorgane transportiert, was zunächst auch für *Ruta graveolens* vermutet wurde. Der gewebespezifische Nachweis von ACS-Transkripten zeigte aber, dass die Synthese von Acridonalkaloiden am Ort der Speicherung stattfindet (Junghanns *et al.*, 1998).

E. 9 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind die Grundlage für die Bearbeitung einer Reihe weiterer relevanter Themen.

Weitere Aussagen über die Enzymstruktur sowie Bindung und Katalyse der Substrate durch die ANMT sind notwendig. Dazu muss die Kristallisation des Enzyms erfolgen, was einen Schwerpunkt für weiterführende Untersuchungen bedeutet. Diese Ergebnisse können dann für anschließenden Mutagenesestudien dienen. Da die RgANMT Ähnlichkeit zu OMTn zeigt, ist es vielleicht möglich, durch Mutagenesen der beteiligten Substratbindestellen, die RgANMT in eine Methyltransferase mit veränderter Substratspezifität umzuwandeln. Dies konnte bereits für OMTn aus *Basilikum* gezeigt werden konnte (Gang *et al.*, 2002).

Von großem Interesse sind auch weiterführende Lokalisierungsstudien der ANMT in der Pflanze, wie sie bereits für die ACS aus *Ruta graveolens* durchgeführt wurden (Junghanns *et al.*, 1998). Die Acridonalkaloide befinden sich überwiegend in der Wurzel lokalisiert. Auch die ACS ist verstärkt im Wurzelgewebe angereichert, jedoch nicht ausschließlich. Um neben den bereits durchgeführten RT-PCR Untersuchungen zur Verteilung der ANMT in unterschiedlichen Geweben weitere Erkenntnisse zu erhalten, ist ein Einsatz des ANMT-spezifischen Antikörpers zur Detektion denkbar. Dies könnte Auskunft darüber geben, ob die Anreicherung von Acridonen in anderen Geweben durch eine Translokation der Endprodukte der Biosynthese und/oder exprimierten Genprodukten aus den Wurzeln abläuft (Junghanns *et al.*, 1998). Erste Versuche wurden bereits durchgeführt (Rohde *et al.*, 2008).

Durch die Klonierung der ANMT sind auch einige biotechnologische Anwendungen zur Untersuchung der Regulation der Anthranilatbiosynthese gegeben. Das als Grundlage für die Acridonalkaloidbiosynthese notwendige Anthranilat ist im primären Metabolismus für die Synthese von Tryptophan wichtig. *Arabidopsis thaliana* bildet keine Acridone und stellt daher ein optimales Modellsystem für gentechnische Untersuchungen dar. Bei einer Expression der RgANMT in *Arabidopsis* müsste Anthranilat gleichzeitig für unterschiedliche Biosynthesewege als Ausgangssubstrat dienen. Ob ein Wachstum von solchen transgenen Pflanzen überhaupt möglich ist oder die Pflanze einen solchen Eingriff intern z.B. durch Gensilencing regulieren kann, wird erst durch entsprechende Versuche sichtbar.

Wegen der Ähnlichkeit der ANMT zu OMTn, vor allem zu Kaffeat-OMTn, und um einen weiteren Einblick in die Evolution von Methyltransferasen zu erhalten, bietet sich eine Klonierung der Kaffeat-OMT aus *R. graveolens* oder weiterer ANMT aus anderen Rutaceen

an. Dies würde evtl. auch Anhaltspunkte liefern, warum sich die Acridonbiosynthese überwiegend auf die Familie der Rutaceen beschränkt.

Unterstützend zu allgemeinen evolutionären Studien wäre die Untersuchung des genomischen Klons der RgANMT und dessen Intronstruktur im Vergleich zu anderen MTn sinnvoll. Auch die Feststellung der Kopienanzahl der ANMT im *Ruta graveolens* Genom mittels Southern Blot wäre denkbar. Dies würde die Charakterisierung der RgANMT vervollständigen.

Um die Erkenntnisse der Acridonbiosynthese zu komplementieren, ist auf jeden Fall die Isolation der beteiligten CoA Ligase notwendig. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit fanden parallel auch für dieses Enzym Untersuchungen statt. Einige der verwendeten chromatographischen Reinigungsschritte für die ANMT stellten sich dabei auch für eine Isolation der CoA Ligase als geeignet heraus. Die Charakterisierung dieses Enzyms könnte die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen. Dabei liegt der Fokus in der Aufklärung der Substratspezifität.

F. Zusammenfassung

Zusammenfassung

Acridone stellen einen eher ungewöhnlichen Alkaloidtyp dar, da sich ihr Vorkommen bisher mit wenigen Ausnahmen nur auf die Familie der Rutaceae beschränkt. Über die Synthese der Acridonalkaloide und ihre Bedeutung für die Pflanze ist bisher nur wenig bekannt. Eine nachweislich antikanzerogene Wirkung gibt ihnen eine gewisse pharmazeutische Bedeutung (Gröger, 1988)

Ruta graveolens L., die Weinraute, ist eine im Mittelmeerraum beheimatete Staude, die bereits in der Antike als Heil- und Gewürzpflanze Verwendung fand. Wegen der in *Ruta graveolens* enthaltenen Acridone, ist sie eine exzellente Modellpflanze für die Untersuchung von deren Biosynthese, was durch bereits etablierte *Ruta*-Zellkulturen vereinfacht wird.

Die Anthranilat *N*-Methyltransferase (ANMT) nimmt eine bedeutende Stellung ein. Das Enzym leitet durch eine *N*-Methylierung Anthranilat aus dem primären in den sekundären Stoffwechsel u.a. in die Biosynthese von Acridonen ein. Bisher war jedoch jeder Versuch einer Isolierung der ANMT aus *Ruta graveolens* erfolglos (Burga, 2005; Maier *et al.*, 1995).

Aus induzierten *Ruta graveolens* Zellkulturen konnte nun durch klassische Proteinreinigung eine Proteinbande von ca. 40 kDa partiell gereinigt werden. Nach anschließender Mikrosequenzierung wurden die dabei erhaltenen Peptidfragmente zur Erstellung degenerierter Primer verwendet, die erfolgreich für eine Amplifizierung der vollständigen RgANMT-cDNA eingesetzt wurden. Es zeigte sich ein offener Leserahmen von 1095 bp, der für eine Polypeptidsequenz von 365 Aminosäuren kodiert.

Das in *E. coli* rekombinant exprimierte Enzym zeigte sich spezifisch für Anthranilat mit K_m -Werten von 7,1 μM für Anthranilat und 3,3 μM für das Co-Substrat SAM. Andere getestete Substrate wurden nicht akzeptiert. Auch Anthraniloil-CoA unterlag keiner Methylierung, wodurch eindeutig bestätigt wird, dass in *Ruta graveolens* zunächst eine *N*-Methylierung von Anthranilat durch die ANMT erfolgt. Erst im darauffolgenden Schritt findet eine Aktivierung durch die korrespondierende CoA Ligase statt.

Die weitere biochemische Charakterisierung zeigte eine optimale Enzymaktivität bei pH 7,5 in Natrium-Glycinat-Puffer und die höchste Enzymaktivität bei einer Temperatur von 37 °C. Außerdem wurde für die ANMT eine Hemmung durch zweiwertige Metallionen, vor allem durch Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} nachgewiesen. Eine Beeinflussung durch Mg^{2+} -Ionen ist nicht gegeben, was die Einordnung der ANMT in die Klasse II pflanzlicher MTn zulässt. Diese

Zuordnung wurde zudem durch die Bestimmung des molekularen Gewichts mittels SDS-PAGE mit 40 kDa und durch Gelpermeationschromatographie mit 80 kDa bestätigt. So konnte auch deutlich gezeigt werden, dass es sich beim aktiven Enzym um ein Homodimer handelt.

Zur weiteren Charakterisierung fanden Expressionsstudien der ANMT sowohl in der Zellkultur als auch direkt in der Pflanze statt. Für beide Systeme konnte eine konstitutive Expression der ANMT gezeigt werden, was die Bedeutung der Acridone als Phytoanticipine verdeutlicht. Bei der Zellkultur zeigte sich durch Hefeinduktion eine Zunahme sowohl der ANMT-Proteinmenge als auch der Aktivität. In der Pflanze zeigte sich die stärkste Akkumulation von mRNA-Transkripten in Blüten und Wurzeln. Aber auch in Blättern und Stängeln konnten Transkripte nachgewiesen werden. Somit scheint in *Ruta graveolens* keine Verlagerung der Acridone aus der Wurzeln in die anderen Pflanzenteile notwendig zu sein wie für viele Alkaloide anderer Pflanzenarten beschrieben (Junghanns *et al.*, 1998).

Überraschend waren sowohl die hohe Identität der primären ANMT-Sequenz als auch die phylogenetische Einordnung der ANMT in die Gruppe der *O*-Methyltransferasen, was eine Verwandtschaft der ANMT zu dieser MT-Klasse zeigt. Dies lässt den Schluss zu, dass sich die ANMT höchstwahrscheinlich aus einem Zweig der *O*-Methyltransferasen bzw. einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt hat.

Die erfolgreiche Isolierung der ANMT stellt einen bedeutenden Schritt nicht nur für die Aufklärung der Acridonbiosynthese dar. Damit ist ein mächtiges Werkzeug für die Durchführung von Regulationsstudien gegeben, in denen die Auswirkungen auf Pflanzen ohne Acridonbiosynthese nach Transformation mit einem ANMT-Konstrukt beobachtet werden können. Durch die unerwartet hohe Ähnlichkeit der ANMT zu OMTn, wird zusätzlich die Bedeutung der ANMT-Isolation für die evolutionäre Betrachtung von MTn deutlich.

Summary

Acridones represent a special type of alkaloids as they were identified so far mainly from genera belonging to the Rutaceae family. There is only little information about their biosynthesis and benefit to the plant.

Ruta graveolens L., the common rue, is a small evergreen shrub originating from the mediterrainien region. It was used as a traditional medicinal herb and spice already in the ancient world. The accumulation of acridones renders *Ruta graveolens* an excellent model plant for investigating their biosynthesis *in vitro*; this task was greatly simplified by introducing elicitor-inducible *Ruta* cell suspension cultures.

The Anthranilate *N*-methyltransferase (ANMT) is catalysing an important step in acridone biosynthesis by channeling anthranilate from primary into secondary metabolism; however, the isolation of the enzyme failed so far (Maier *et al.*, 1995; Burga, 2005).

A protein band of approximately 40 kDa could be partially purified from elicitor-induced *Ruta graveolens* cell cultures. After peptide microsequencing, degenerated primers were designed, which were successfully applied for amplification of a full length cDNA in combination with RACE techniques. The cDNA exhibits an open reading frame of 1095 bp, coding for a polypeptide sequence of 365 amino acids with a calculated mass of 40059 Da and a predicted isoelectric point (pI) of 5,72.

After recombinant expression in *E. coli* the enzyme showed narrow substrate specificity with K_m -values of 7,1 μM and 3,3 μM for anthranilate and *S*-adenosyl-L-methionine (SAM), respectively. No other tested substrates were accepted. Most interestingly, anthraniloyl-CoA was not converted; this provides evidence that in *Ruta graveolens* the first step in acridone biosynthesis is the *N*-methylation of anthranilate yielding *N*-methylantranilate, followed by an activation to the corresponding CoA-ester. Acridones without the *N*-methylation pattern might be demethylated later in the biosynthetic pathway.

Biochemical characterization showed an optimal enzyme activity in sodium-glycinate-buffer pH 7.5 at 37 °C. Enzyme activity is inhibited by metal ions, especially Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} . No influence of Mg^{2+} -ions was detected, which clusters the ANMT into class II of SAM-dependent plant methyltransferases (MTs). This is confirmed by the molecular mass of 40 kDa for the denatured protein on SDS-PAGE and 80 ± 5 kDa for the native active protein on a calibrated gel permeation chromatography column. Enzyme activity can thus be assigned to a homodimer, as described for most SAM-dependant plant MTs.

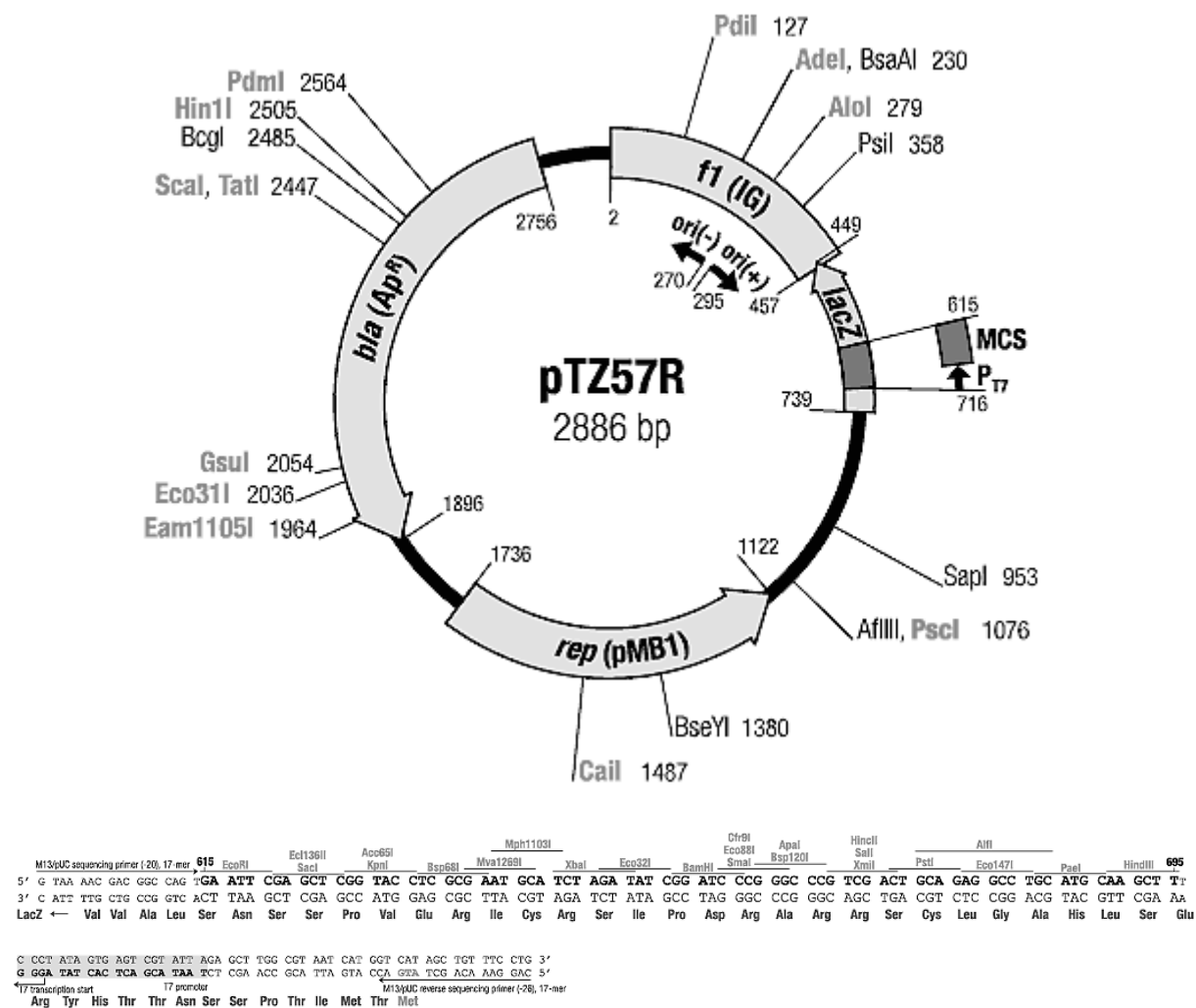
For further characterization, expression studies in *Ruta* cell cultures and plants were conducted. Both systems showed a constitutive expression of the ANMT, which emphasises the function of the acridone alkaloids as phytoanticipins. The cell culture showed a slight increase in protein amount and enzyme activity upon induction with yeast elicitor. In intact plants, the highest abundance of RgANMT transcripts was found in flowers and roots, with lower amounts in leaves and stems. These findings coincide with the main locations of acridone alkaloid biosynthesis, so that no translocation of acridones from roots into other plant tissues seems to be required as described for other alkaloid types in other plant genera (cf. Junghanns *et al.*, 1998).

Phylogenetic analysis revealed a surprisingly high similarity of the ANMT polypeptide to the group of *O*-methyltransferases (OMTs), which points to an evolutionary relation of the ANMT to this MT class.

The successful isolation and characterization of the ANMT represents an important step not only for the understanding of acridone biosynthesis. It also provides an important tool for studies on the regulation of acridone biosynthesis or anthranilate metabolism, respectively.

G. Anhang

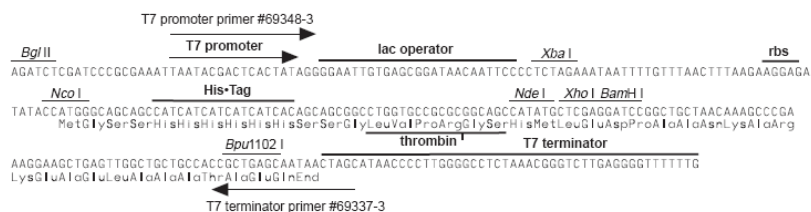
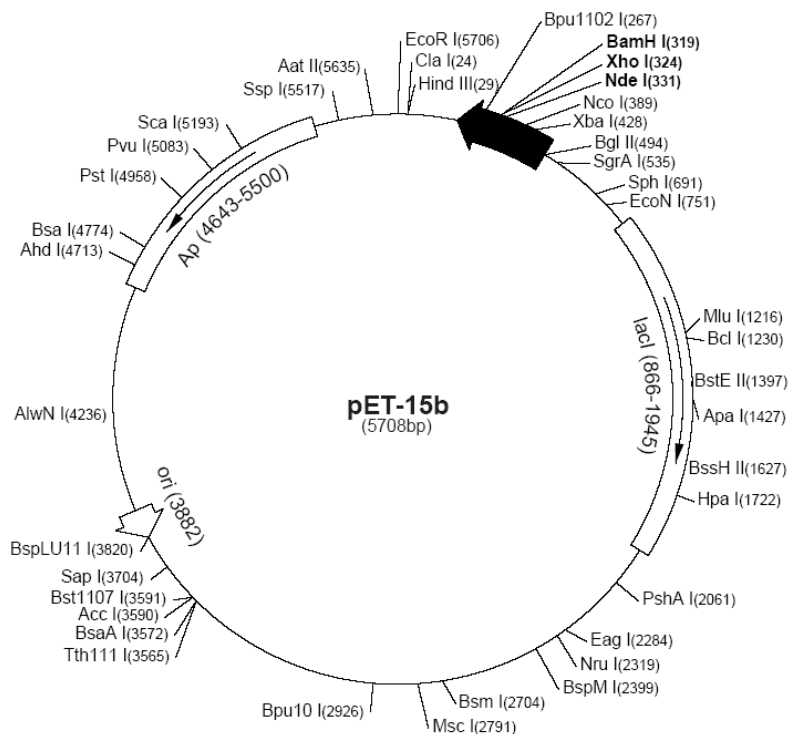
G. 1 Vektorkarte pTZ57R (MBI Fermentas; St. Leon Roth)



G.2 Vektorkarte pET15b (Novagen; Darmstadt)

pET-15b sequence landmarks

T7 promoter	463-479
T7 transcription start	452
His•Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites (<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
lacI coding sequence	(866-1945)
pBR322 origin	3882
<i>bla</i> coding sequence	4643-5500



pET-15b cloning/expression region

H. Literaturverzeichnis

- Altenschmidt, U. und Fuchs, G.** (1992). Novel aerobic 2-aminobenzoate metabolism. Purification and characterization of 2-aminobenzoate-CoA ligase, localisation of the gene on a 8-kbp plasmid, and cloning and sequencing of the gene from a denitrifying *Pseudomonas* sp.. FEBS **205**, 721-727.
- Altenschmidt, U., Oswald, B. und Fuchs, G.** (1991). Purification and characterization of benzoate-coenzyme A ligase and 2-aminobenzoate coenzyme A ligases from a denitrifying *Pseudomonas* sp.. J. Bacteriology **173**, 5494-5501.
- Ashihara, H. und Crozier, A.** (2001). Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. Trends in Plant Sci. **6**, 407-413.
- Attieh, J.M., Hanson, A.D. und Saini, H.S.** (1995). Purification and characterization of a novel methyltransferase responsible for biosynthesis of halomethanes and methanethiol in *Brassica oleracea*. J. Biol. Chem. **270**, 9250-9257.
- Attieh, J., Sparace, S.A. und Saini, H.S.** (2000). Purification and properties of multiple isoforms of a novel thiol methyltransferase involved in the production of volatile sulfur compounds from *Brassicae oleracea*. Arch. Biochem. Biophys. **380**, 257-266.
- Attieh, J., Djiana, R., Koonjul, P., Étienne, C. Sparace, S.A. und Saini, H.S.** (2002) Cloning and functional expression of two plant thiol methyltransferases : a new class of enzymes involved in the biosynthesis of sulfur volatiles. Plant Mol. Biol. **50**, 511-521.
- Baumert, A. und Gröger, D.** (1985). Synthesis of 1,3-dihydroxy-*N*-methylacridone by cell-free extracts of *Ruta graveolens* cell suspension cultures. FEBS Letters **187**, 311-313.
- Baumert, A., Hieke, M. und Gröger, D.** (1983). *N*-Methylation of anthranilic acid to *N*-methylantranilic acid by cell-free extracts of *Ruta graveolens* tissue cultures. Planta Med. **48**, 258-262.
- Baumert A., Kuzovkina, I.N. und Gröger, D.** (1985). Activation of anthranilic acid and *N*-methylantranilic acid by cell-free extracts from *Ruta graveolens* tissue cultures. Planta Med. **51**, 125-127.
- Baumert, A., Kuzovkina, I.N., Krauss, G., Hieke, M. und Gröger, D.** (1982). Biosynthesis of rutacridone in tissue cultures of *Ruta graveolens* L.. Plant Cell Rep. **1**, 168-171.
- Baumert, A., Maier, W. und Gröger, D.** (1994). Purification and properties of acridone synthase from cell suspension cultures of *Ruta graveolens* L.. Z. Naturforsch. **49c**, 26-32.
- Baumert, A., Maier W. und Gröger, D.** (unveröffentlicht). Partial purification and characterization of *N*-methylantranilate : Coenzyme A ligase from cell suspension cultures of *Ruta graveolens*.
- Baumert, A., Schmidt, J. und Gröger, D.** (1993). Synthesis and mass spectral analysis of Coenzyme A thioesters of anthranilic acid and its *N*-methyl derivatives involved in acridone alkaloid biosynthesis. Phytochem. Anal. **4**, 165-170.

- Becela-Deller, C.** (1991). Die Weinraute-Heilpflanze zwischen Magie und Wissenschaft. Deut. Apotheker Zeitung **131**, 2705-2708.
- Becela-Deller, C.** (1995). *Ruta graveolens* L. – Weinraute. Z. für Phytotherapie **16**, 275-281.
- Bensadoun, A. und Weinstein, B.** (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. Anal. Biochem. **70**, 201-250.
- Bohlmann, J., Lins, T., Martin, W. und Eilert, U.** (1996). Anthranilate Synthase from *Ruta graveolens* – Duplicated Asa genes encode tryptophan-sensitive and tryptophan-insensitive isoenzymes specific to amino acid and alkaloid biosynthesis. Plant Physiol. **111**, 507-514.
- Bugos, R.C., Chiang, V.L.C., und Campbell, W.H.** (1991). cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin-bispecific caffeic acid/5-hydroxylferulic acid O-methyltransferase of aspen. Plant Mol. Biol. **17**, 1203-1215.
- Burga, L.** (2005). Methyltransferases from *Ruta graveolens* L.: molecular biology and biochemistry. Dissertation, Marburg/Lahn.
- Burga, L., Wellmann, F., Lukačín, R., Witte, S., Schwab, W., Schröder, J. und Matern, U.** (2005). Unusual pseudosubstrate specificity of a novel 3,5-dimethoxyphenol O-methyltransferase from *Ruta graveolens* L.. Phytochemistry **440**, 54-64.
- Charron, J.-B.F., Breton, G., Danyluk, J., Muzac, I., Ibrahim, R.K. und Sarhan, F.** (2002). Molecular and biochemical characterization of a cold-regulated phosphoethanolamine N-methyltransferase from wheat. Plant Physiol. **129**, 363-373.
- Chen, X. und Wood, A.J.** (2004). Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine nicotinic acid N-methyltransferase from leaves of *Glycine max*. Physiol. Planta. **48**, 531-535.
- Choi, K.-B., Morishige, T. und Sato, F.** (2001). Purification and characterization of coclaurine N-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. Phytochemistry **56**, 649-655.
- Choi, K.-B., Morishige, T., Shitan, N., Yazaki, K. und Sato, F.** (2002). Molecular cloning and characterization of coclaurine N-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica*. J. Biol. Chem. **277**, 830-835.
- Coiner, H., Schröder, G., Wehinger, E., Liu, C.-H., Noel, J.P., Schwab, W. und Schröder, J.** (2006). Methylation of sulfhydryl groups: a new function for a family of small molecule plant O-methyltransferases. Plant J. **46**, 193-205.
- Danert, S.** (1976). Ordnung Rurales in: Urania Pflanzenreich in 3 Bänden. Höhere Pflanzen 2 (Band 3). (Hrsg. Christoph Needon) Urania-Verlag Leipzig, Jena, Berlin.
- D'Auria, J.C., Chen, F. und Pichersky, E.** (2003). The SABATH family of MTs in *Arabidopsis thaliana* and other plant species. In: Romeo, J.T. (Ed.), Recent Advances in Phytochemistry, Vol. 37. Elsevier Science & Technology, Oxford, 253-283.

- De Feo, V., De Simone, F. und Senatore, F.** (2002). Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry* **61**, 573-578.
- Dixon, R.A., Chen, F., Guo, D. und Parvathi, K.** (2001). The biosynthesis of monolignols: a „metabolic grid“, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochemistry* **57**, 1069-1084.
- Dumas, B., Doorselaere, J.V., Gielen, J., Legrand, M., Fritig, B., Montagu, M.V. und Inzé, D.** (1992). Nucleotide sequence of a complementary DNA encoding *O*-methyltransferase from poplar. *Plant Physiol.* **98**, 796-797.
- Eilert, U.** (1994). *Ruta* in: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Band 6. Drogen P-Z. (Hrsg. Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, H. und Schneider, G.) Springer Verlag, Berlin, 1994.
- Eilert, U., Wolters, B. und Constabel, F.** (1986). Ultrastructure of acridone alkaloid idioblasts in roots and cell cultures of *Ruta graveolens*. *Can. J. Bot.* **64**, 1089-1096.
- Eilert, U. und Wolters, B.** (1989). Elicitor of *S*-adenosyl-L-methionine: Anthranilic acid *N*-methyltransferase activity in cell suspension and organ cultures of *Ruta graveolens* L.. *Plant Cell, Tissue and Org. Culture* **18**, 1-18.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. und Henrik Nielsen, H.** (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nat. Protocols* **2**, 953-971.
- Facchini, P.J. und Park, S.-U.** (2003). Development and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry* **64**, 177-186.
- Ferrer, J.-L., Zubieta, C., Dixon, R.A. und Noel, J.P.** (2005). Crystal structures of alfalfa caffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase. *Plant Physiol.* **137**, 1009-1017.
- Frenzel, T. und Zenk, M.H.** (1990). Purification and characterization of three isoforms of *S*-adenosyl-*L*-methionine:-(*R,S*)-Tetrahydrobenzylisoquinoline-*N*-methyltransferase from *Berberis koetianeana* cell cultures. *Phytochemistry* **29**, 3491-3497.
- Frick, S. und Kutchan, T.M.** (1999). Molecular cloning and functional expression of *O*-methyltransferases common to isoquinoline alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis. *Plant J.* **17**, 329-339.
- Frohman, M.A., Dush, M.K. und Martin, G.R.** (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002.
- Frohne, D. und Jensen, U.** (1998). Systematik des Pflanzenreiches – unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Gang, D.R., Lavid, N., Zubieta, C., Chen, F., Beuerle, T., Lewinsohn, E., Noel, J.P., und Pichersky E.** (2002). Characterization of phenylpropene *O*-methyltransferases from sweet basil: facile change of substrate specificity and convergent evolution within a plant *O*-methyltransferase family. *The Plant Cell* **14**, 505-519.

- Gauthier, A., Gulick, P.J. und Ibrahim, R.K.** (1998). Characterization of two cDNA clones which encode *O*-methyltransferases for the methylation of both flavonoid and phenylpropanoid compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* **351**, 243-249.
- Giuliano, G., Bartley G.E. und Scolnik, P.A.** (1993). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell* **5**, 379-387.
- Glawischnig, E.** (2007). Camalexin. *Phytochemistry* **68**, 401-406.
- Gowri, G., Bugos, R.C., Campbell, W.H., Maxwell, C.A. und Dixon, R.A.** (1991). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **97**, 7-14.
- Gröger, D.** (1988). Vorkommen und Biochemie der Acridon-Alkaloide – Ein Fortschrittsbericht. *Pharmazie* **43**, 815-826.
- Hall, T.A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis programm for windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Hayakawa, T., Nanto, K., Kawai, S., Katayama, Y. und Morohoshi, N.** (1996). Molecular cloning and tissue-specific expression of two genes that encode caffeic acid *O*-methyltransferase from *Populus kitakamiensis*. *Plant Sci.* **113**, 157-165.
- Hemann, M.** (2004). Klonierung von *O*-Methyltransferasen zur Furanocumarinbiosynthese in *Ammi majus* L.. Dissertation, Marburg/Lahn.
- Heywood, V.H. und Vernon, H.** (1982) Blütenpflanzen der Welt, Birkenhäuser Verlag, Basel.
- Hibi, N., Higashiguchi, S. Hashimoto, T. und Yamada, Y.** (1994). Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *The Plant Cell* **6**, 723-735.
- Holton, T.A. und Lester, D.R.** (1996). Cloning of novel cytochrome P450 gene sequences via polymerase chain reaction amplification. *Methods Enzymol.* **272**, 275-283.
- Ibdah, M., Zhang, X.-H., Schmidt, J. und Vogt, T.** (2003). A novel Mg²⁺-dependent *O*-methyltransferase in the phenylpropanoid metabolism of *Mesembryanthemum crystallinum*. *J. Biol. Chem.* **278**, 43961-43972.
- Ibrahim, R.K. und Muzac, I.** (2000). The methyltransferase gene superfamily: a tree with multiple branches. In: Recent Advances in Phytochemistry – Vol. 34 (Evolution of metabolic pathways). Ed.: Romeo, J.T., Ibrahim, R., Varin, L. und De Luca, V., Pergamon, Amsterdam.
- Ibrahim, R.K., Bruneau, A. und Bantignies, B.** (1998). Plant *O*-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. *Plant Mol. Biol.* **36**, 1-10.
- Isihara; A., Asada, Y., Takahasi, Y, Yabe, N., Komeda, Y., Nishioka, T., Miyagawa, H. und Wakasa, K.** (2006). Metabolic changes in *Arabidopsis thaliana* expressing the feedback-resistant anthranilate synthase α subunit gene *OAS1D*. *Phytochemistry* **67**, 2349-2362.

- James, F., Nolte, K.D. und Hanson, D.** (1995). Purification and properties of *S*-Adenosyl-L-methionine:L-methionine *S*-Methyltransferase from *Wollastonia biflora* leaves. *J. Biol. Chem.* **270**, 22344-22350.
- Joshi, C.P. und Chiang, V.L.** (1998). Conserved sequence motifs in plant *S*-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Mol. Biol.* **37**, 663-674.
- Junghanns, K.T., Kneusel, R.E., Baumert, A., Maier, W., Gröger, D. und Matern, U.** (1995). Molecular cloning and heterologous expression of acridone synthase from elicited *Ruta graveolens* L. cell suspension cultures. *Plant Mol. Biol.* **27**, 681-692.
- Junghanns, K.T., Kneusel, R.E., Gröger, D. und Matern, U.** (1998). Differential regulation and distribution of acridone synthase in *Ruta graveolens*. *Phytochemistry* **49**, 403-411.
- Kato, M., Mizuno, K., Fujimura, T., Iwama, M., Irie, M., Crozier, A. und Ashihara, H.** (1999). Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves. *Plant Physiol.* **120**, 579-586.
- Kato, M., Mizuno, K., Crozier, A., Fujimura, T. und Ashihara, H.** (2000). Caffeine synthase gene from tea leaves. *Nature* **406**, 956-957.
- Kagan, R.M. und Clarke, S.** (1994). Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse *S*-Adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggest a common structure for these enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 417-427.
- Klosa, R. und Zänglein, A.** (1987). *Ruta graveolens*-Die Gartenraute. *Z. für Phytotherapie* **8**, 202-206.
- Kranz, K. und Petersen, M.** (2003). β -Peltatin 6-*O*-methyltransferase from suspension cultures of *Linum nodiflorum*. *Phytochemistry* **64**, 453-458.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-684.
- Larsson, K.A.E., Zetterlund, I., Delp, G. und Jonsson, L.M.V.** (2006). *N*-methyltransferase involved in gramine biosynthesis in barley: cloning and characterization. *Phytochemistry* **67**, 2002-2008.
- Lee, J.E., Kleinhofs, A., Graner, A., Wegener, S., Parthier, B. und Löbner M.** (1997). Genomic sequence and mapping of a methyljasmonate-induced *O*-methyltransferase from barley (*Hordeum vulgare* L.). *DNA Sequence* **7**, 357-363.
- Lowry, O.H., Roesbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J.** (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Li, H.M., Rotter, D., Hartmann, T.G., Pak, F.E., Havkin-Frenkel, D. und Belanger, F.C.** (2006). Evolution of novel *O*-methyltransferase from the *Vanilla planifolia* caffeic acid *O*-methyltransferase. *Plant Mol. Biol.* **61**, 537-552.

- Liscombe, D.K. und Facchini, P.J.** (2007). Molecular cloning and characterization of Tetrahydroprotoberberine cis-*N*-methyltransferase, an enzyme involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *J. Biol. Chem.* **282**, 14741-14751.
- Lukačín, R., Schreiner, S. und Matern, U.** (2001). Transformation of acridone synthase to chalcone synthase, *FEBS Letters* **508**, 413-417.
- Maier, W., Schumann, B. und Gröger, D.** (1990). Biosynthesis of acridone alkaloids- Formation of rutacridone by cell-free extracts of *Ruta graveolens* cell suspension cultures. *FEBS* **263**, 289-291.
- Maier, W., Baumert, A., Schumann, B., Furukawa, H. und Gröger, D.** (1993). Synthesis of 1,3-Dihydroxy-*N*-methylacridine and its conversion to rutacridone by cell-free extracts of *Ruta graveolens* cell cultures. *Phytochemistry* **32**, 691-698.
- Maier, W., Baumert, A. und Gröger, D.** (1995). Partial purification and characterization of *S*-adenosyl-L-methionine:anthranilic acid *N*-methyltransferase from *Ruta* cell suspension cultures. *J. Plant Physiol.* **145**, 1-6.
- Martin, J.L. und McMillan, F.M.** (2002). SAM (dependent) I AM: the *S*-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current Opinion in Structural Biology* **12**, 783-793.
- McCarthy, A.A. und McCarthy, J.G.** (2007). The structure of two *N*-methyltransferases from the caffeine biosynthetic pathway. *Plant Physiol.* **144**, 879-889.
- Milesi, S., Massot, B., Gontier, E., Bourgaud, F. und Guckert, A.** (2001). *Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of furanocoumarins. *Plant Sci.* **161**, 189-199.
- Meepagala, K.M., Schrader, K.K., Wedge, D.E. und Duke, O.S.** (2005). Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogues. *Phytochemistry* **66**, 2689-2695.
- Moffatt, B.A. und Weretilnyk, E.A.** (2001). Sustaining *S*-adenosyl-L-methionine-dependant methyltransferase activity in plant cells. *Physiol. Planta.* **113**, 435-442.
- Naidoo, D., Coombes, P.H., Mulholland, D.A., Crouch, N.R. und van den Bergh, A.J.J.** (2005). *N*-substituted acridone alkaloids from *Toddaliopsis bremekampii* (Rutaceae: Toddalioidae) of south-central africa. *Phytochemistry* **66**, 1724-1728.
- Noel, J.P., Dixon, R.A., Pichersky, E., Zubieta, C. und Ferrer, J.-L.** (2003) Structural, functional, and evolutionary basis for methylation of plant small molecules. In: Romeo, J.T. (Ed.), *Recent Advances in Phytochemistry*, Vol. 37. Elsevier Science & Technology, Oxford, 37-58.
- Nuccio, M.L., Ziemak, M.J., Henry, S.A., Weretilnyk, E.A. und Hanson, A.D.** (2000). cDNA cloning of Phosphoethanolamine *N*-methyltransferase from spinach by complementation in *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of the recombinant enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**, 14095-14101.

- Ogita, S., Uefuji, H., Morimoto, M. und Hiroshi, S.** (2004). Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant Mol. Biol.* **54**, 931-941.
- Ounarooun, A., Decker, G., Schmidt, J., Lottspeicher, F. und Kutchan, T.M.** (2003). (*R,S*)-Reticuline 7-*O*-Methyltransferase and (*R,S*)-norcoclaurine 6-*O*-methyltransferase of *Papaver somniferum* – cDNA cloning and characterization of methyl transferase enzymes of alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant J.* **36**, 808-819.
- Pahlow, M.** (1993) Das große Buch der Heilpflanzen. Gräfe und Unzer Verlag GmbH, München.
- Parmar, V.S., Jain, S.C., Gupta, S., Talwar, S., Rajwanshi, V.K., Kumar, R., Azim, A., Malhotra, S., Kumar, N., Jain, R., Sharma, N.K., Tyagi, O.D., Lawrie, S.J., Errington, W., Howarth, O.W., Olsen, C.E., Singh, S.K. und Wengel, J.** (1998). Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. *Phytochemistry* **49**, 1069-1078.
- Pellegrini, L., Geoffroy, P., Fritig, B. und Legrand, M.** (1993). Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-*O*-methyltransferases induced in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves by infection or elicitor treatment. *Plant Physiol.* **103**, 509-517.
- Pichersky, E. und Gang, D.R.** (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Sci.* **5**, 439-445.
- Pimenta, M.J., Kaneta, T., Larondelle, Y. Und Kamiya, Y.** (1998). *S*-adenosyl-*L*-methionine:*L*-methionine *S*-methyltransferase from germinating barley. Purification and localization. *Plant Physiol.* **118**, 431-438.
- Preisig, C.L., Matthews, D.E. und VanEtten, H.D.** (1989). Purification and characterization of *S*-adenosyl-*L*-methionine:6a-Hydroxymaackiain 3-*O*-methyltransferase from *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* **91**, 559-566.
- Rakwal, R., Agrawal, G.K., Yonekura, M. und Kodama, O.** (2000). Naringenin 7-*O*-methyltransferase involved in the biosynthesis of the flavonone phytoalexin sakuranetin from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* **155**, 213-221.
- Raman, S.B. und Rathinasabapathi, B.** (2003). β -alanin *N*-methyltransferase of *Limonium latifolium*. cDNA cloning and functional expression of a novel *N*-methyltransferase implicated in the synthesis of the osmoprotectant β -alanine betaine. *Plant Physiol.* **132**, 1642-1651.
- Rathinasabapathi, B., Sigua, C., Ho, J. und Gage, D.A.** (2000). Osmoprotectant β -alanine betaine synthesis in the Plumbaginaceae: *S*-adenosyl-*L*-methionine dependent *N*-methylation of β -alanine to its betaine is via *N*-methyl and *N,N*-dimethyl β -alanines. *Physiol. Planta.* **109**, 225-231.
- Rohde, B., Hans, J., Martens, S., Baumert, A., Hunziker, P. und Matern, U.** (2008). Anthranilate *N*-methyltransferase, a branch-point enzyme of acridone biosynthesis. *Plant J.* **53**, 541-553.
- Roje, S.** (2006). *S*-Adenosyl-*L*-methionine: Beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry* **67**, 1686-1698.

- Ross, J.R., Nam, K.H., D'Auria, J.C. und Pichersky, E.** (1999). *S*-Adenosyl-L-methionine:salicylate acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represent a new class of plant methyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* **367**, 9-16.
- Sato, F., Tsujita, T., Katagiri, Y., Yoshida, S. und Yamada, Y.** (1994). Purification and characterization of *S*-adenosyl-L-methionine:norcoclaurine 6-*O*-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *FEBS* **225**, 125-131.
- Sandermann, H und Strominger, L.** (1972). Purification and properties of C₅₅-isoprenoid alcohol phosphokinase from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **247**, 5123-5131.
- Schluckebier, G., O'Gara, M., Saenger, W. und Cheng, X.** (1995). Universal catalytic domain structure of AdoMet-dependent methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **247**, 16-20.
- Schreiner, S.** (2004). Molekulare Untersuchungen zur Spezifität von Polyketidsynthasen aus *Dictamnus albus* L. und *Ruta graveolens* L.. Dissertation Marburg/Lahn.
- Schröder, G., Wehinger, E. und Schröder, J.** (2002). Predicting the substrates of cloned plant *O*-methyltransferase. *Phytochemistry* **59**, 1-8.
- Schubert, H.L., Blumenthal, R.M. und Cheng, X.** (2003). Many paths to methyl transfer: a chronicle of convergence. *Trends in Biochem. Sci.* **28**, 329-335.
- Schwab, W.** (2003). Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites ? *Phytochemistry* **62**, 837-849.
- Siminszky, B., Gavalano, L., Bowen, S.W. und Dewey, R.E.** (2005). Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 14919-14924.
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. und Bresinsky, A.** (2002) Strasburger – Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, 35. Auflage.
- Skaltsounis, A.L., Mitaku, S. und Tillequin, F.** (2000). Acridone alkaloids. In: *The Alkaloids – Volume 54*. Ed.: Cordell, G.A., Academic Press, San Diego.
- Smith, D.E. und Fisher, P.A.** (1984). Identification, developmental regulation, and response to heat shock of two antigenically related forms of a major nuclear envelope protein in *Drosophila* embryos: application of an improved method for affinity purification of antibodies using polypeptides immobilized on nitrocellulose blots. *J. Cell Biology* **99**, 20-28.
- Sprecher, E.** (1958). Über den Einfluss genetischer und klimatischer Faktoren auf die Biosynthese sekundärer Pflanzenstoffe der Weinraute (*Ruta graveolens* L.). *Pharmazie* **13**, 151-153.
- Stenzel, O., Teuber, M. und Dräger, B.** (2006). Putrescine *N*-methyltransferase in *Solanum tuberosum* L., a calystegine-forming plant. *Planta* **223**, 200-212.

- Tagmount, A., Berken, A. und Terry, N.** (2002). An essential role of *S*-adenosyl-L-methionine *S*-methyltransferase in selenium volatilization by plants. Methylation of selenomethionine to selenium-methyl-L-selenium-methionine, the precursor of volatile selenium. *Plant Physiol.* **130**, 847-856.
- Toquin, V., Grausem, B., Geoffroy, P. und Legrand, M.** (2003). Structure of the tobacco caffeic acid *O*-methyltransferase (COMT) II gene: identification of promoter sequences involved in gene inducibility by various stimuli. *Plant Mol. Biol.* **52**, 495-509.
- Uefuji, H., Ogita, S., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. und Sano, H.** (2003). Molecular cloning and functional characterization of three distinct *N*-methyltransferases involved in the caffeine biosynthetic pathway in coffee plants. *Plant Physiol.* **132**, 372-380.
- VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A. und Farmer, E.E.** (1994). Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "Phytoanticipins". *The Plant Cell*, **6**, 1191-1192.
- Van Haandel, M.J.H., Sarab  r, F.C.E., Boersma, M.G., Laane, C., Fleming, Y., Weenen, H. und Rietjens, I.M.C.M.** (2000). Characterization of different commercial soybean peroxidase preparations and use of the enzyme for *N*-demethylation of methyl *N*-methylantranilate to produce the food flavor methylantranilate. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1949-1954.
- Vidgren, J., Svensson, L.A. und Liljas, A.** (1994). Crystal structure of catechol *O*-methyltransferase. *Nature* **368**, 354-358.
- Waldhauser, S.S.M., Gillies, F.M., Crozier, A. und Baumann, T.W.** (1997). Separation of the *N*-7 methyltransferase, the key enzyme in caffeine biosynthesis. *Phytochemistry* **45**, 1407-1414.
- Wang, J. und Pichersky, E.** (1997). Nucleotide sequence of *S*-adenosyl-L-methionine:caffeic acid 3-*O*-methyltransferase from *Clarkia breweri*. *Plant Physiol.* **114**, 1567-1569.
- Wang, J. und Pichersky, E.** (1998). Characterization of *S*-adenosyl-L-methionine:(Iso)eugenol *O*-methyltransferase involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Arch. Biochem. Biophys.* **349**, 153-160.
- Wang, J. und Pichersky, E.** (1999). Identification of specific residues involved in substrate discrimination in two plant *O*-methyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* **368**, 172-180.
- Wang, J. und De Luca, V.** (2005). The biosynthesis and regulation of biosynthesis of concord grape fruit esters, including 'foxy' methylantranilate. *Plant J.* **44**, 606-619.
- Winkel-Shirley, B.** (1999). Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiol. Planta.* **107**, 142-149.
- Wu, S., Watanabe, N., Mita, S., Ueda, Y., Shibuya, M. und Ebizuka, Y.** (2003). Two *O*-methyltransferase isolated from flower petals of *Rosa chinensis* var. *spontanea* involved in scent biosynthesis. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 119-128.

Xia, X. und Xie, Z. (2001). DAMBE: Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *J. Heredity* **92**, 371-373.

Zhao, N., Guan, J., Lin, H. und Chen, F. (2007). Molecular cloning and biochemical characterization of indole-3-acetic acid methyltransferase from poplar. *Phytochemistry* **68**, 1537-1544.

Zubieta, C., He, X.-Z., Dixon, R.A. und Noel, J.P. (2001). Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant *O*-methyltransferases. *Nature Struct. Biol.* **8**, 271-279.

Zubieta, C., Kota, P., Ferrer, J.-L., Dixon, R.A. und Noel, J.P. (2002). Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-*O*-methyltransferase. *The Plant Cell* **14**, 1265-1277.

Zubieta, C., Ross, J.R., Koscheski, P., Yang, Y., Pichersky, E. und Noel, J.P. (2003). Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. *The Plant Cell* **15**, 1704-1716.

Danksagung

Nachfolgend möchte ich mich bei den Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn Professor Dr. Ulrich Matern für die Überlassung dieses interessanten und sehr aspektreichen Themas, sowie die zahlreichen Anregungen und Tipps für die praktische Durchführung dieser Arbeit.

Frau Professor Dr. Maike Petersen möchte ich herzlich für die Übernahme der Zweitkorrektur und viele hilfreiche Diskussionen danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Peter Hunziker vom Functional Genomics Center der Universität Zürich für die erfolgreiche Proteinsequenzierung.

Herrn Dr. Joachim Hans danke ich für die wertvolle Unterstützung gerade in den wichtigen Phasen dieser Arbeit. Durch seine große Diskussionsbereitschaft und die Einarbeitung in neue Methoden hat er mir durch seine stets aufmunternde Art und Weise sehr geholfen.

Herrn Dr. Stefan Martens möchte ich für die Hilfe bei den phylogenetischen Untersuchungen und die freundliche Zusammenarbeit in den letzten Jahren danken.

Herrn Dr. Dieter Kreusch danke ich für die Unterstützung bei verwaltungstechnischen Angelegenheiten.

Ein herzlicher Dank gilt auch allen Arbeitskollegen und Ehemaligen des Instituts der Pharmazeutischen Biologie für das freundliche Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung in der gesamten Zeit meiner Promotion.

ERKLÄRUNG

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

Acridonbiosynthese in *Ruta graveolens* L.:
Molekularbiologie und Biochemie der
Anthranilat *N*-Methyltransferase

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den.....

.....
(Britta Rohde)